

Einfluss von Statinen auf hypoxieinduzierte Proliferation humaner Endothelzellen

SEBASTIAN WEITERER

INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2010

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2010

© 2010 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Einfluss von Statinen auf hypoxieinduzierte Proliferation humaner Endothelzellen

INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sebastian Weiterer

aus Northeim

Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik I
Abteilung für Kardiologie und Angiologie
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Harald Tillmanns

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. A. Erdogan
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. K.-D. Schlüter

Tag der Disputation: 21.06.2010

Meinen Eltern
Regina und Ulrich Weiterer

Meinem Bruder
Alexander Weiterer

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 Einflussfaktoren der Angiogenese	7
1.2 Bedeutung des Endothels für die Pathogenese der Arteriosklerose und des Tumorwachstums	8
1.3 Einfluss der mitogen aktivierten Protein Kinasen	11
1.4 Die Rolle von Calcium in der Zelle	12
1.5 Die Rolle von <i>Reaktive Oxygen Species</i> in der Zelle	13
1.6 Statine, die Hemmer der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reductase	15
1.7 Ziel der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Zellkultur	18
2.1.1 HUVEC	18
2.1.2 Zellidentifikation	18
2.1.3 Kultivierung	19
2.2 Proliferation	21
2.2.1 Zellzählung mit der Neubauerkammer	21
2.2.2 Proliferationsmessungen mit dem CyQuant® Proliferationsassay	22
2.3 Fluoreszenzmessungen	24
2.3.1 Fura-2-Imaging	24
2.3.2 2', 7'-Dichlorofluoresceinacetat-Radikalmessungen	25
2.3.3 Zellviabilität	26
2.4 Chemikalien	27
2.5 Statistik	29
3. ERGEBNISSE	30
3.1 Cyanidinduzierte Endothelzellproliferation	30
3.1.1 Die cyanidinduzierte Proliferation im Vergleich zu der stickstoff-induzierten Proliferation	30
3.1.2 Einfluss von Calcium auf cyanidinduzierte Proliferation	31

Inhaltsverzeichnis

3.1.3 Einfluss der <i>Reactive Oxygen Species</i> auf cyanidinduzierte Proliferation	32
3.1.4 Die Bedeutung der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase für die cyanidinduzierte Proliferation	33
3.2 Die Interaktion von cyanidinduziertem Calcium und <i>Reactive Oxygen Species</i>	34
3.2.1 Wirkung von Cyanid und BAPTA auf die endotheliale <i>Reactive Oxygen Species</i> -Bildung	34
3.2.2 Fura-2-Ratio: Der Einfluss von Diphenyleneiodonium auf den cyanid-induzierten Calciumanstieg	36
3.3 Der Effekt der Statine auf die cyanidinduzierte endotheliale Proliferation	38
3.3.1 Der konzentrationsabhängige Effekt der Statine auf die cyanidinduzierte Proliferation	39
3.3.2 Einfluss der Statine auf die Zellviabilität	40
3.3.3 Wirkung von Mevalonat auf den proliferationshemmenden Statineffekt	40
3.4 Einfluss der Statine auf die durch Cyanid verursachte Calciumausschüttung und <i>Reaktive Oxygen Species</i> -Bildung	41
3.4.1 Einfluss der Statine auf die Calciumausschüttung	42
3.4.2 Einfluss der Statine auf die <i>Reaktive Oxygen Species</i> -Bildung	43
4. DISKUSSION	45
4.1 Cyanidinduzierte Proliferation der <i>Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells</i>	46
4.2 Die Rolle der <i>Reaktive Oxygen Species</i> -Bildung und Calciumausschüttung in der hypoxieinduzierten Endothelzellproliferation	47
4.3 Statine beeinflussen die cyanidinduzierte endotheliale Proliferation	51
4.4 Statine beeinflussen die Bildung von <i>Reaktive Oxygen Species</i> und den Calciumanstieg	54
4.5 Klinische Aspekte	58
5. ZUSAMMENFASSUNG	61
6. LITERATURVERZEICHNIS	63

Inhaltsverzeichnis

7. ABKÜRZUNGEN	76
8. ERKLÄRUNG	79
9. PUBLIKATIONEN	80
10. DANKSAGUNG	81
11. LEBENSLAUF	82

1. Einleitung

1.1 Einflussfaktoren der Angiogenese

In der vorliegenden Arbeit wird der Effekt verschiedener Statine auf die endotheliale Proliferation und somit auf einen Aspekt der Angiogenese untersucht.

Als Angiogenese wird die Ausbildung neuer Gefäßstrukturen ausgehend von bereits vorhandenen Blutgefäßen bezeichnet. Zur Angiogenese kommt es bei Wundheilung oder bei Revaskularisierung von unterversorgtem Gewebe, welches durch das primär vorhandene Gefäß nicht mehr ausreichend versorgt werden kann. Diese Gefäßneubildung spielt in der Pathophysiologie vieler Erkrankungen, wie zum Beispiel Atherosklerose, Diabetes mellitus, Krebs oder rheumatoider Arthritis, eine wichtige Rolle. Für die Angiogenese ist die Endothelzellaktivierung von besonderer Bedeutung, allerdings sind die genauen molekularen Mechanismen noch nicht vollständig untersucht [1] [2].

Bis vor Kurzem ging man davon aus, dass Angiogenese hauptsächlich durch Wachstumsfaktoren reguliert wird. Zu den wichtigsten Wachstumsfaktoren gehören der *Epidermal Growth Factor* (EGF), *Transforming Growth Factor Alpha* (TGF- α), *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) und *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Sie bewirken die Proliferation und Migration der Endothelzellen, wodurch der Prozess der Angiogenese in Gang gesetzt wird [1] - [5].

Neuere Daten zeigen, dass eine angiogenetische Zellantwort bei Endothelzellen auch autonom, also ohne den äußeren Einfluss von VEGF oder anderer Wachstumsfaktoren, ausgelöst werden kann. Die Endothelzellen wurden einer temporären Sauerstoffunterversorgung, Hypoxie, mit anschließender Re-oxygenierung ausgesetzt, um dadurch den Stimulus zur Angiogenese zu geben. Versuche mit Schweineendothelzellen zeigten, dass es durch diese Hypoxie zur Bildung von *Reactive Oxygen Species* (ROS) kommt und eine Aktivierung der ERK (*Extracellular Signal regulated Protein Kinase*), einer mitogen aktivierten Proteinkinase (MAPK), induziert wird. Die Aktivierung dieses Enzyms zieht eine Endothelzellproliferationssteigerung und somit eine Förderung der Angiogenese nach sich. Auch ein erhöhter Calciumeinstrom bewirkt eine vermehrte Translokation der MAPK p42 in den Nukleus und wirkt somit proliferativ auf Endothelzellen [6] [7].

1.2 Bedeutung des Endothels für die Pathogenese der Arteriosklerose und des Tumorwachstums

In den letzten Jahren haben Untersuchungen immer mehr gezeigt, dass die Funktion der Endothelzellen über die einer Barriere zwischen Blut und umliegenden Gewebe hinausgeht und somit pathophysiologisch und klinisch eine weit aus größere Bedeutung hat.

Unter physiologischen Bedingungen besteht zwischen dem Endothel und den umgebenen Strukturen, wie der glatten Gefäßmuskelschicht, eine starke Wechselwirkung, welche Einfluss auf die Endothelzellproliferation und den Gefäßtonus hat. Durch diese Interaktion werden die vaskuläre Homöostase und die Flexibilität der Gefäße in Bezug auf äußere und innere Faktoren aufrechterhalten:

Das Endothel selbst sezerniert verschiedene Mediatoren, die direkt auf die glatte Gefäßmuskelschicht wirken, um den Gefäßtonus zu regulieren. Durch die Freisetzung von Acetylcholin, Adenosintriphosphat (ATP) und anderer Metabolite kommt es lokal durch Stickstoffmonoxid (NO), das auch als *Endothelium Derived Relaxing Faktor* (EDRF) bezeichnet wird, zur Vasodilatation. Gegenregulatorisch hat Endothelin-1 auf verschiedene Rezeptoren eine starke vasokonstriktorische Wirkung. Darüber hinaus hat das Endothel auf das fließende Blut sowohl anti-adhäsive als auch anti-thrombotische Effekte [8].

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie können zur Schädigung des Endothels und zu Veränderungen der Fließeigenschaft des Blutes führen. Die aus der Schädigung des Endothels resultierende endotheliale Dysfunktion demonstrierte Furchgott [10] an Blutgefäßen *in vitro*. Die erkrankten Gefäße reagierten auf die Gabe von Acetylcholin nicht wie oben erwähnt mit einer Vasodilatation, sondern paradoxer Weise mit einer Vasokonstriktion. Dies wird wiederum durch die Entstehung von oxidiertem *Low-Density Lipoprotein* (LDL) und Krankheiten, wie Arteriosklerose, arterieller Hypertonie und Thrombose gefördert [9] [10].

Bei dem geschädigten Endothel ändert sich auch die Interaktion mit den glatten Muskelzellen, so dass die hemmenden Effekte auf Proliferation und Migration nicht mehr gegeben sind. Somit ist das fließende Gleichgewicht zwischen dem Organismus und seiner Umwelt gestört [9] - [11].

Arteriosklerose wird in der Literatur zunehmend als eine inflammatorische Krankheit gesehen, zu deren speziellen Risikofaktoren hohe Plasmakonzentrationen von *Low-Density Lipoprotein* (LDL) Cholesterol zählen [12]. Modifiziertes (oxidiertes) LDL ist ein wichtiger pathologischer Faktor für die verminderte Funktionsfähigkeit des Endothels, da es vermehrt in den Subendothelialraum eingeschwemmt wird. Makrophagen sind über die an ihrer Oberfläche befindlichen *Scavenger*-Rezeptoren in der Lage, in der Arterie befindliche LDL-Partikel aufzunehmen (Inkorporation). Dieser Prozess wird durch verschiedene Mediatoren wie *Makrophagen Colony Stimulation Factor* (M-CSF), Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-1 β vermittelt und führt zu einer Formation von Lipidperoxiden. Die Inkorporation des oxidierten LDL fördert die Akkumulation von Cholesterol-Estern, wodurch aus den Makrophagen die so genannten Schaumzellen (*foam-cells*) entstehen. Die Schaumzellen bilden initial zusammen mit lipidgeladenen Monozyten und T-Lymphozyten, welche durch TNF- α , Interleukin-2 und Granulozyten-Makrophagen-Stimulations-Faktor aktiviert werden, makroskopisch sichtbare weißliche Fettablagerungen, die als *Fatty-streaks-formation* bezeichnet werden. Hieraus entwickeln sich, nach einer Vermehrung durch *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), *Fibroblast Growth Factor-2* und *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β) vermittelten Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen, die entgültigen Plaques. Die Verdickung der Intima durch die *Fatty-streak-formation* und den eingewanderten proliferierten glatten Muskelzellen fördert die Ausbildung der atherosklerotischen Plaques, da es aufgrund längerer Diffusionsstrecken eine relative Ischämie in den Gefäßzellen fördert [12] - [15].

Welche pathologischen Konsequenzen die ischämischen Effekte der Plaques auf die Proliferation der Gefäßzellen haben, zeigt sich durch nähere Betrachtung der hypoxischen Wirkung auf zellulärer Ebene. Zellen werden *per diffusionem* mit Sauerstoff versorgt. Ist die Distanz zwischen Gefäß und zu versorgendem Areal zu groß, kommt es in diesem Bereich zu einer Sauerstoffunterversorgung, zu Hypoxie [100]. Hypoxie stimuliert die Proliferation der Endothelzellen und bewirkt auf diese Weise Angiogenese. Die atherosklerotischen Veränderungen in der Gefäßwand bewirken eine Ischämie, die eine Durchsprössung der Plaques mit Mikrogefäßen induziert [101]. Die durch die Endothelzellproliferation entstandenen neuen Gefäße sind nach Theorien von Modifi et al. [16] fragil, was zu Einblutungen in die Plaques führen kann (intraplaque-Haemorrhagien). Durch die Einblutungen nehmen die

Einleitung

Plaques an Volumen zu und werden instabil, wodurch die Entstehung von arteriellen Dissektionen, Ulzerationen und Thrombosen begünstigt wird [14] [17] [18].

Eine andere wichtige Rolle spielt die Neovaskularisation von Endothelzellen bei der Tumorentstehung. Das Wachstum und die Ausbreitung eines Tumors ist nicht nur abhängig von der Proliferation der Tumorzellen, sondern auch von der Angiogenese und somit auch von der Proliferation der Endothelzellen in den Tumorgefäßen [19]-[26].

Durch das rapide Tumorzellwachstum entsteht in den schnellwachsenden Gebieten eines Tumors ein hypoxisches Areal, da die Tumorzellproliferation in diesen Bereichen so stark erhöht ist, dass die bereits existierenden Gefäße diese nicht über Sauerstoffdiffusion versorgen können. Wie bei den bereits weiter oben beschriebenen pathologischen Vorgängen, die zur Plaquesprossung atherosklerotischer Gefäße führen, bewirkt die hypoxieinduzierte Endothelzellproliferation auch in Tumoren ein instabiles Kapillarwachstum, was zu Einblutungen in den Tumor führt [30].

Persistierende Hypoxie führt zur Apoptose, das heißt zum programmierten Zelltod [30]. Auf der anderen Seite entsteht durch hypoxischen Stress ein selektiver Druck auf die Tumorzellen, welcher die Bildung von Zellmutationen und Tumorwachstum fördert. Es zeigte sich, dass ischämische Zustände und die daraus resultierende Angiogenese die Tumorentstehung fördern [30].

Andererseits kann durch die Hemmung der Gefäßneubildung die Ausbreitung eines gefährlichen Tumors verhindert werden. Experimente, bei denen die Angiogenese gehemmt, aber das Tumorwachstum gefördert wurde, haben gezeigt, dass Tumore nicht über eine gewisse, für den Wirt laut Folkman ungefährliche Größe von 1 mm^3 oder weniger, heranwachsen [19] - [26] [27]. Durch Gabe von anti-angiogenetischen Proteinen, wie Thrombosponin-1, konnte beobachtet werden, wie die Tumorgöße mit verringerter Konzentration zunimmt [28] [29]. So konnte bewiesen werden, dass die alleinige Blockade der Neovaskularisation trotz hoher Tumorzellproliferationsraten zu einem harmlosen, mikroskopischen, nicht angiogenetischen Residual führt [27].

Die oben beschriebenen Studien zeigen, welchen bedeutenden Einfluss die Endothelzellproliferation auf das Fortschreiten verschiedener Krankheiten und deren Symptomatik besitzt.

1.3 Einfluss der mitogen aktivierten Protein Kinasen

Durch verschiedene Einflussfaktoren werden in einer Zelle unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt, die an der Proliferation von Endothelzellen beteiligt sind. Im Folgenden soll unter anderem speziell auf die Ras-Raf-ERK-Kaskade (Ras = *rat sarcoma viral oncogene homolog*; Raf = *Ras associated factor*) eingegangen werden. Diese Kettenreaktion zur Proliferationssteigerung kann beispielsweise rezeptorvermittelt ausgelöst werden. Durch VEGF oder andere Wachstumsfaktoren kommt es Wachstumsfaktor-spezifisch zur Aktivierung einer Tyrosinkinase. Diese Tyrosinkinase vermittelt in der Zelle die Aktivierung der monomeren GTP-ase Ras. Nachdem Ras in seine aktive Form überführt ist, setzt es seinerseits die Serin/Threonin-Kinase Raf-1 in Gang. Raf-1 wiederum bildet einen Komplex mit der MEK (MAPK/ERK-Kinase), einer MAP-Kinase-Kinase, was eine Phosphorylierung von Serin und somit eine Aktivierung der MEK zur Folge hat. Die MEK ist eine dualspezifische Threonin/Tyrosin-Kinase. Sie phosphoryliert die ERK 1 und 2, die *Extracellular Signal regulated Protein* Kinasen, die auch als MAP-Kinase 44/42 bezeichnet werden. Die MEK aktiviert die MAP-Kinasen durch eine Phosphorylierung sowohl an ihrem Threonin- als auch an ihrem Tyrosin-Rest. Die aktivierte MAP-Kinase wird calciumabhängig in den Nukleus transloziert und beeinflusst durch Aktivierung von Transskriptionsfaktoren, wie beispielsweise den *Nuclear Factor κ B* (NF- κ B) und dem *Aktivator Protein 1* (AP-1), die Endothelzellproliferation [2] [31] - [38] [58] [98] [97].

Neuere Forschungen brachten die Erkenntnis, dass es nicht nur rezeptorvermittelt durch VEGF und andere Wachstumsfaktoren zur Aktivierung des mitogenen Transduktionsweges durch die p44/42MAP-Kinase kommt, sondern dieser Prozess auch hypoxievermittelt ausgelöst werden kann. Schäfer et al. demonstrierten, dass die hypoxieinduzierte ROS-Bildung eine vermehrte MEK/ERK-Aktivierung bewirkt [7]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Hypoxie eine calciumvermittelte proliferative Endothelzellantwort zur Folge hat. Sowohl die Calciumkonzentration als auch die ROS-Bildung haben auf die Endothelzellproliferation einen starken Einfluss, worauf in den folgenden Abschnitten näher eingegangen wird [6] [7] [31] [39].

1.4 Die Rolle von Calcium in der Zelle

Calcium ist an einer Vielzahl von Prozessen im Körper beteiligt. Auch in der einzelnen Zelle ist Calcium ein wichtiges Element zur Signalübertragung. Die Freisetzung von endothelialen Mediatoren und die Synthese verschiedener Enzyme werden durch Calcium getriggert, woraus ein direkter Einfluss auf die endotheliale Funktion und die Zellhomöostase resultiert [43].

Zwei Mechanismen sind für das intrazelluläre Calciumgleichgewicht von entscheidender Bedeutung: das intrazelluläre und das extrazelluläre Calciumsystem. Während der Hyperpolarisation der Zelle kommt es zur Verschiebung des elektrochemischen Gradienten für Calcium. Es erfolgt ein Calciumeinstrom von extrazellulär. Dieser Calciumeinstrom verläuft überwiegend passiv über nicht selektive extrazelluläre Kationenkanäle, da Endothelzellen im Gegensatz zu glatten Muskelzellen nicht über spannungsgesteuerte Calciumkanäle vom L-Typ verfügen. Die Stärke des Calciumeinstromes von extrazellulär wird durch den elektrochemischen Gradienten der Zelle bestimmt, welcher durch das Membranpotential geregelt ist [40] [41] [42]. Beeinflusst wird der elektrochemische Gradient durch calciumabhängige Kalium- und Chloridkanäle, die eine Aufrechterhaltung der relativen Hyperpolarisation der Zelle in der Plateauphase des vorübergehenden Calciumanstiegs bewirken. Der intrazelluläre Calciumanstieg resultiert dann in einer Depolarisation der Zelle [40] [42] [43].

Der wichtigste Trigger für die intrazelluläre Calcium-Freisetzung ist Inositol 1,4,5-triphosphat, welches über die Aktivierung von Phospholipase C (PLC) geregelt wird. Die Phospholipase C ist ein in der Plasmamembran befindliches Enzym und wird hauptsächlich über ein G-Rezeptorprotein gesteuert. Der Calcium-Einstrom steht in Relation zum Füllungszustand der intrazellulären endoplasmatischen Calciumspeicher [42]. In dem „two pool model“ von M.J. Berridge ist beschrieben, dass ein primärer Calciumanstieg, welcher durch die Freisetzung aus den Inositol 1,4,5-triphosphat sensitiven Speichern und einem von extrazellulär kommenden Calciumeinfluss entstanden ist, nicht ausreicht, um einen signifikanten Anstieg im Zytosol zu erreichen. Das freigesetzte Calcium wird zunächst in nicht Inositol 1,4,5-triphosphat sensitiven Speichern, die über das gesamte Zytosol verteilt sind, angesammelt, und erst dann vollständig freigesetzt, wenn alle Speicher voll sind [44].

Die zytosolischen endothelialen Calciumquellen können durch externe Stimuli zum Anstieg von intrazellulärem Calcium veranlasst werden. Auch hypoxische Zellzustände, durch die ein Energiedefizit verursacht wird, bewirken eine Calciumerhöhung. Durch transiente Hypoxie kommt es zu einer Steigerung des Calciumeinstromes, wobei sich der normale Calciumstand bei nachfolgender Reoxygenierung wieder einstellt [45]. Auch die durch transiente Hypoxie induzierte Calciumausschüttung ist nicht nur von intrazellulären Speicherorganen abhängig, denn auch extrazelluläres Calcium ist nötig, um eine ausreichend hohe Calciumkonzentration aufrecht zu erhalten [46] [47] [67] [86]. Generell hält der Calciumeinstrom von extrazellulär nach Mobilisation solange an, bis die intrazellulären Calciumspeicher der Endothelzellen wieder gefüllt sind [48].

Viele Faktoren, wie die *Reaktive Oxygen Species* (ROS), haben starken Einfluss auf den Calciumspiegel. Speziell die ROS, die NAD(P)H-Oxidase(Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat-Oxidase)-abhängig entstanden sind, zeigen eine Assoziation mit der intrazellulären Calciumkonzentration. Holland et al. [49] führten Versuche mit humanen Endothelzellen durch, in denen die ROS-Bildung durch Calciumantagonisten geblockt werden konnte, und demonstrierten damit die Abhängigkeit zwischen der intrazellulären Calciumkonzentration und der ROS-Bildung. Welche weitere wichtige Rolle die ROS im Zellgleichgewicht haben, soll in dem folgenden Teilabschnitt erläutert werden.

1.5 Die Rolle von *Reaktive Oxygen Species* in der Zelle

Unter *Reactive Oxygen Species* (ROS) versteht man sowohl Sauerstoffradikale, wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot -}$), das Hydroxyl Radikal (OH^{\cdot}) und das Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}), als auch die nicht Radikal-Derivate, wie Hydrogen Peroxid (H_2O_2) und Hypochlorsäure (HOCl).

Es hat sich gezeigt, dass ROS nicht nur „ungewollte Moleküle“ sind, die an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren pathologische Veränderungen bewirken. Die intrazelluläre Bildung von ROS hat auch eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der Homöostase und nimmt regulierend Einfluss auf das Zellgleichgewicht. Sowohl die ROS-Bildung als auch der ROS-Abbau sind über verschiedene Enzyme kontrolliert [50]:

Einleitung

Unterschiedliche Faktoren und Enzyme sind für die Sauerstoffradikalbildung verantwortlich. Speziell in der Plasmamembran sind dies Enzyme, wie die endotheliale NO-Synthase (eNOS), die NAD(P)H-Oxidase, die Cyclooxygenase, die Lipidoxygenase, aber auch lösliche Enzyme, wie die Xanthin-Oxidase [51] [52]. Auch äußere Faktoren sorgen in der Zelle für ROS-Stimulation: mechanischer Stress, LDL oder Umweltfaktoren, wie toxische Chemikalien [52] [53].

Für die Atherosklerose ist die erhöhte Konzentration von ROS sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen und Zellen der Adventitia von Bedeutung [53]. Eines der wichtigsten ROS in den Gefäßen ist das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot -}$). Es wird durch die univalente Reduktion aus trivalentem molekularem Sauerstoff gebildet (3O_2) [54] [51]. Dieser Prozess wird speziell durch die NAD(P)H-Oxidase und die Xanthin-Oxidase gesteuert. Die Bedeutung der NAD(P)H-Oxidase zeigt sich an der Beteiligung an verschiedenen Krankheiten, die sich auf das Gefäßsystem auswirken. Atherosklerose ist hierfür ein wichtiges Beispiel [18] [55] [56] [57].

ROS steht über noch nicht ausreichend erforschte Weise mit der intrazellulären Calciumkonzentration in Verbindung. Es konnte gezeigt werden, dass die Calciumkonzentration sowohl direkt an den Calciumkanälen, dem Inositoltriphosphat-Rezeptor, dem Ryanodinrezeptor als auch über Calciumkanal-aktivierende Enzyme durch Radikalbildung beeinflusst wird. Auf diese Weise reguliert die Calciumkonzentration die Signaltransduktion, die die Balance zwischen Zellproliferation, Zellzyklusaktivierung und Zelltod bestimmt [58] [102] [103] [104] [105] [106].

Holland et al. [49] beschreiben, dass ROS durch Calciumantagonisten geblockt werden können. Speziell die Radikale, die durch NAD(P)H-Oxidaseaktivität entstanden sind, beeinflussen den Inositoltriphosphat-Rezeptor und stehen so in Verbindung mit der intrazellulären Calcium-Konzentration [58] [106].

In Bezug auf Endothelzellen ist der Effekt von ROS sehr vielfältig. Sowohl die Vasomotorik als auch die Expression von Adhäsionsmolekülen und der Apoptosevorgang werden durch ROS-Bildung beeinflusst. [50] [58]

ROS haben einen Einfluss auf die Proliferation von Endothelzellen und sind dadurch an der Angiogenese beteiligt [59] [55]. In der Literatur ist beschrieben, dass eine Proliferationssteigerung direkt durch ROS, wie beispielsweise H_2O_2 , induziert werden kann [59] [55].

Aber nicht nur die ROS-Synthese ist geregelt, sondern auch der Abbau der Radikale wird durch verschiedene Enzyme gesteuert. Im Laufe der Evolution sind Enzyme entstanden, die Sauerstoffradikale und deren Folgeprodukte abbauen. Beispielsweise katalysiert die Superoxid-Dismutase (SOD) $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 , H_2O_2 wird wiederum über die Katalase abgebaut. Weitere Abbaumechanismen werden durch die Glutathion-Peroxidase oder durch Thioredoxin vermittelt [60].

Unter physiologischen Bedingungen besteht eine Balance zwischen der Höhe der in einem normalen Zellmetabolismus bestehenden ROS-Produktion und dem Maß der endogenen Antioxidantien. Die antioxidativen Moleküle sind in der Lage, bis zu einem gewissen Maß oxidativen Schaden zu vermeiden. Dieses Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau von ROS durch diese speziellen Moleküle und den entsprechenden Enzymen ist für die Erhaltung der Zelle und der Zellphysiologie von großer Bedeutung [36] [54].

Tritt ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Synthese und dem oxidativen Abbau auf, bezeichnet man dies als oxidativen Stress. Dies führt zu einer Vielzahl pathologischer Zustände [60]. So ist oxidativer Stress beim Menschen verbunden mit einer Reduktion der vaskulären extrazellulären Superoxid-Dismutase sowie einer Progression der koronaren Herzerkrankung [53].

Die genannten Einflüsse der ROS spielen bei der Entstehung weiterer Erkrankungen eine wesentliche Rolle. Speziell die NAD(P)H-Oxidase stellt eine potentielle Quelle der ROS bei der Entstehung von Atherosklerose, Hypertension und Diabetes mellitus dar [55].

1.6 Statine, die Hemmer der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase

Eine Medikamentengruppe, die eine wichtige Rolle bei der Behandlung verschiedener Krankheiten spielt, die mit der Beteiligung von Angiogenese und Neovaskularisation assoziiert sind, sind die HMG-CoA-Reduktase inhibierenden Statine (HMG = β -Hydroxy- β -methylglutaryl) (CoA = Coenzym A).

Das zytosolische HMG-CoA wird durch die HMG-CoA-Reduktase, dem geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Cholesterinbiosynthese, in Mevalonat

(Mev) umgewandelt. Statine haben sowohl auf atherosklerotische Läsionen als auch auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität einen reduzierenden Effekt. Darüber hinaus vermindern Statine die Proliferation von Endothelzellen, was sich hemmend auf die Intimaneovaskularisation auswirkt, die, wie bereits beschrieben, sowohl Einfluss auf das Plaquewachstum der Atherosklerose als auch auf die Entwicklung von bösartigen Tumoren hat. Deshalb ist es von wesentlicher Bedeutung, den Wirkmechanismus dieser Medikamente und deren antiangiogenetischen Effekt zu untersuchen. Neben ihrer lipidsenkenden Fähigkeit haben die Statine pleiotrope Effekte auf das Endothel. Sie bewirken eine direkte Verbesserung der endothelialen Dysfunktion durch Stimulation von Vasodilatoren und haben einen dämpfenden Einfluss auf Vasokonstriktoren [27] [61] - [64].

In Bezug auf die endotheliale Proliferation haben Statine einen biphasischen Effekt. Bei Weis et al. [65] und Asakage et al. [66] konnte gezeigt werden, dass eine niedrige Statinkonzentration einen Proliferationsanstieg bewirkt. Eine erhöhte Konzentration hingegen zeigt eine Reduktion der mitogenen Zellantwort durch gesteigerte Apoptose. Apoptose ist, wie die Nekrose, eine Form des Zelltodes, bei der im Gegensatz zum nekrotischen Zelluntergang ein aktiver, programmierter Zelltod durchgeführt wird [65] [66].

Es ist von großem Interesse, die verschiedenen Eigenschaften der Statine und ihre komplizierten Wirkmechanismen auf Endothelzellen näher zu erforschen, um ihren Nutzen für den klinischen Alltag zu optimieren.

1.7 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Punkte untersucht:

1. Entspricht eine Cyanid-induzierte Endothelzellproliferation einer „realen“ Hypoxie mit 100% Stickstoff?
2. Ist die ausgelöste Hypoxie Calcium- oder ROS-abhängig, und besteht eine Abhängigkeit dieser beiden Wirkmechanismen zu einander?
3. Können der hypoxieinduzierte Calciumanstieg und die durch hypoxieinduzierte Bildung von ROS durch Statine beeinflusst werden?
4. Ist eine durch Hypoxie ausgelöste mitogene Zellantwort der Endothelzellen komplett durch die Statine Cerivastatin, Fluvastatin und Simvastatin aufhebbar?

Zur Versuchsdurchführung wurden *Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells* (=HUVECs; Endothelzellen von menschlichen Umbilikalvenen) verwendet. Als Modell für eine vorübergehende Hypoxie diente eine Kurzzeitinkubation mit Natriumcyanid (NaCN, im weiteren Textverlauf mit „CN“ abgekürzt). Dieses hat sich bereits bei der Erzeugung von hypoxischen Zuständen und Reperfusion in kardiovaskulären Zellen bewährt [67] [68].

Stellvertretend für die Gruppe der Statine wurden Cerivastatin, Simvastatin und Fluvastatin verwendet.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Verfahren wurden alle, nach der von Jaffè et al. beschriebenen Methode durchgeführt [69].

2.1.1 HUVEC

Für alle Versuche wurden aus humanen Umbilikalvenen stammenden Endothelzellen (HUVECs) (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Promo Cell garantiert hierbei die höchsten ethischen und gesetzlichen Standards: Es wird gewährleistet, dass alle Spender des humanen Materials ihre schriftliche Zustimmung zur Verarbeitung des gewonnenen Gewebes gegeben haben und ausgiebig über die Verwendung informiert wurden. Ferner spricht sich Promo Cell für die strikte Einhaltung ethischer und wissenschaftlicher Grundsätze bei der Gewinnung und Isolation der Gewebeproben aus (siehe: www.promocell.com/support/ethical-standards/, zuletzt abgerufen am 23.7.10).

2.1.2 Zellidentifikation

Um nachzuweisen, dass es sich bei den isolierten Zellen um HUVECs handelte, diente zum einen die Beurteilung der Morphologie durch das Lichtmikroskop. Die Endothelzellmorphologie weist als besonderes Charakteristikum eine Anordnung zum Monolayer auf. Endothelzellen liegen hierbei kopfsteinpflasterartig nebeneinander und nicht, wie beispielsweise Fibroblasten oder glatte Muskelzellen, von denen die Endothelzellen abzugrenzen sind, als Spindelform und sich gegenseitig überlagernd vor.

Eine andere Identifikationsmethode ist die Immunfluoreszenzmethode, bei der die HUVECs auf Deckplatten ausgesät und kultiviert werden. Um die Zellen zu fixieren, werden sie bei -20°C mit Methanol inkubiert. Bei dieser Methode hat man sich eine Eigenschaft der Endothelzellen zunutze gemacht, welche andere vaskuläre Zellen

nicht besitzen und die deshalb zur Identifikation genutzt werden kann, denn im Gegensatz zu anderen in den Gefäßen befindlichen Zellen, exprimieren Endothelzellen den von-Willebrand-Faktor.

Zum Nachweis, dass es sich tatsächlich um HUVECs handelte, wurden die Zellen im ersten Schritt mit einem Antikörper gegen den von-Willebrand-Faktor (Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde ein weiterer fluoreszierender Antikörper gegen den Antikörper des von-Willebrand-Faktor (Ziege-Anti-Kaninchen-FITC; Dianova, Hamburg, Deutschland) hinzugegeben. Da der fluoreszierende Antikörper nur an den mit von-Willebrand-Faktor-Antikörper beladenden Endothelzellen haftete, konnten die HUVECs im Mikroskop eindeutig als fluoreszierende Zellen identifiziert werden.

2.1.3 Kultivierung

Zur Kultivierung wurden die Zellen auf 25 cm² Plastik-kulturschälchen (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät. Die Schälchen wurden vorher mit 0,2 % Gelatine (Serva, Heidelberg, Deutschland) beschichtet, um ein besseres und gleichmäßigeres Wachstum zu ermöglichen.

Anschließend wurden die HUVECs bei 37°C und einem CO₂-Anteil von 5 % in einem Brutschrank gelagert. Als Nährmedium wurde *Endothelial Cell Growth Medium* (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland) zusammen mit 5% FCS verwendet.

Im Detail besteht das Nährmedium aus den folgenden Komponenten, mit denen die Zellen in einem T 75er Fläschen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA) resuspendiert wurden:

- 0,004 ml/ml *Endothelial Cell Growth Supplement* / Heparin, ECGS/H, (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland);
- 0,1 ng/ml *human Epidermal Growth Factor*, hEGF (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland);
- 1 µg/ml Hydrocortison, HC (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland);
- 1 ng/ml *human basic Fibroblast Growth Factor*, hbFGF (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland);
- 50 ng/ml Amphotericin B (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland);
- 50 µg/ml Gentamycin 1% (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland);

Material und Methoden

- 0,05 ml/ ml FCS (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland);
- 0,62 ng/ml Phenol red (Promo Cell, Heidelberg, Deutschland).

Generell musste bei der Primärkultur alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Erst nachdem eine Flasche konfluent zugewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde mit Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden herbeigeführt; nach kurzer Inkubation war im Lichtmikroskop bereits die Ablösung erkennbar. Die zuvor noch flach auf dem Boden befindlichen Endothelzellen hatten sich von dem gelatinierten Boden abgekugelt und waren zu frei schwimmenden Zellen geworden. Um das Weiterwirken des Trypsins und somit das Auflösen der Zellen zu verhindern, wurde FCS hinzugegeben.

Nachdem die Zellen 5 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert wurden, wurde der entstandene Überstand verworfen und die Zellen in Nährmedium resuspendiert. Anschließend wurden die HUVECs mit einer Dichte von ca. 3000 Zellen/cm² auf mit 0,2 % Gelatine vorbeschichtete Kulturflaschen erneut ausgesät.

Täglich wurden lichtmikroskopische Kontrollen durchgeführt. Diese dienten nicht nur zur Inspektion der Morphologie und des Zellwachstums, sondern auch der frühzeitigen Feststellung auf möglichen Pilzbefall und eventueller Kontamination der Zellen durch Bakterien. War eine Kulturschale auffällig oder kontaminiert, wurde diese verworfen.

2.2 Proliferation

Zur Analyse des Proliferationsverhaltens der HUVECs auf die Stimulation mit Cyanid sowie auf die Inkubation mit den verschiedenen Statinen, wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet. Eine Methode zur Bestimmung der Proliferation war die Zellzählung mit der Neubauerkammer, eine andere die Messung der DNA-Syntheseleistung durch den CyQuant-Proliferationsassay. Beide Methoden werden in den folgenden Abschnitten näher erklärt.

2.2.1 Zellzählung mit der Neubauerkammer

Für die Zellzählungen wurden die HUVECs auf vorgelatinisierten D2-Schälchen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA) ausgesät. Hierbei wurde eine Zelldichte von 5.000 Zellen pro cm^2 pro Kulturschälchen gewählt. Nach einem 24-stündigen Wachstum wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden in ein serumfreies Medium überführt. Auf diese Weise konnte erreicht werden, dass sich die Zellen den Wachstumszyklus betreffend aufeinander synchronisiert hatten. Anschließend wurden die HUVECs eine Stunde mit HEPES-Pufferlösung (PAA, Linz, Österreich) und den verschiedenen Stimulanzen in den entsprechenden Konzentrationen inkubiert:

2,5 mmol/l Natriumcyanid (NaCN), 1 $\mu\text{mol/l}$ Acetylcystein (ACC), 500 $\mu\text{mol/l}$ Allopurinol (Allo) alle von Sigma (Deisenhofen, Deutschland), 10 $\mu\text{mol/l}$ BAPTA/AM (1,2-Bis(o-aminophenoxy) Ethan-N,N,N',N'-tetraacetic acid), 5 $\mu\text{mol/l}$ Diphenyleneiodonium (DPI), 100 $\mu\text{mol/l}$ Acetylsalicylsäure (ASS), 300 $\mu\text{mol/l}$ N-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), 1–2,5 $\mu\text{mol/l}$ Fluvastatin (Flu), 2,5–5 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin (Sim) alle von Calbiochem (Bad Soden, Deutschland), 0,03–0,1 $\mu\text{mol/l}$ Cerivastatin (Ceri) von Bayer (Wuppertal, Deutschland).

Bei einem der Experimente wurden die HUVECs in den Kulturschälchen mit HEPES-Pufferlösung in einer temperatur- und gaskontrollierten Inkubationskammer installiert und 60 Minuten mit 100% Stickstoff (N_2 ; Messer Griesheim GmbH, Oberhausen, Deutschland) perfundiert. Durch dieses Verfahren wurde der Sauerstoff aus dem Inkubator verdrängt und die Zellen in eine transiente sauerstoffarme Phase versetzt. Nach der Stimulationsphase folgte ein erneuter Mediumwechsel.

Alle Zellen wurden für 48 Stunden in *Endothelial Basal Medium* kultiviert und anschließend durch Trypsin-EDTA vom Boden der Schälchen abgelöst.

Die Zellzählung wurde mit der Neubauerkammer unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Die Mittelwerte aus vier Zählungen pro Schale bildeten die Basisdaten für die Statistik.

2.2.2 Proliferationsmessung mit dem CyQuant® Proliferationsassay

Um die Ergebnisse der Zellzählungen mit der Neubauerkammer zu untermauern, wurde die DNA-Syntheseleistung untersucht. Hierzu diente der Proliferationsassay CyQuant® von Molecular Probes (Leiden, Niederlande).

Die Zellen durchliefen in der Vorbereitung zu diesen Versuchen die gleichen Prozesse wie bei der Vorbereitung der Zellzählungen mit der Neubauerkammer. Sie wurden in 24-Well Platten (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA) ausgesät, und nach einem 24-stündigen Wachstum wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem die Zellen für 24 Stunden serumfrei gesetzt wurden. Die Endothelzellen wurden nach der serumfreien Phase über eine Stunde mit HEPES-Pufferlösung und den entsprechenden Substanzen in den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach 60 Minuten wurde die Stimulationslösung abgesaugt und durch Medium mit 10% FCS ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium wieder abgesaugt.

Im Gegensatz zu dem vorher beschriebenen Zellzählungsverfahren wurden die Zellen beim CyQuant®-Assay nicht mit Trypsin abgelöst, sondern nach Entfernen des Mediums mit flüssigem Stickstoff (N₂; Messer Griesheim GmbH, Oberhausen, Deutschland) schockgefroren. Die gefrorenen Platten konnten nun bei -80°C aufbewahrt werden. Nach dem Auftauen der Platten in der Dunkelkammer wurden die Platten mit 200 µl/well CyQuant®-Reagenz (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) behandelt. Das CyQuant®-Reagenz besteht aus zwei Komponenten. Im ersten Schritt wurde der Lysin-Puffer mit Aquadest 1:20 verdünnt (Komponente B) und im zweiten Schritt die Komponente A (CyQuant® GR) hinzugegeben. Das Prinzip des CyQuant®-Assays beruht darauf, dass Fluoreszenz-markiertes Lysin während der Inkubationszeit in die DNA eingebaut wird. Auf diese Weise kann die DNA-Syntheseleistung quantifiziert werden. Nach Zugabe des Reagenz wurde die

Material und Methoden

Messung der Platten im Platerader durchgeführt, wobei der Farbstoff mit einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und mit 535 nm gemessen wurde. Um einer Verfälschung der Analyse durch andere Wellenlängen vorzubeugen, wurde bei der Herstellung und Durchführung durchgehend im Dunkeln gearbeitet.

Um zu testen, ob der Effekt der Statine durch Mevalonatgabe reversibel ist, wurden Versuche mit Mevalonat (Mev 500 $\mu\text{mol/l}$) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in Kombination mit den verschiedenen Statinen in den entsprechenden Konzentrationen und Cyanid durchgeführt.

2.3 Fluoreszenzmessungen

Im folgenden Teilabschnitt werden verschiedene Verfahren der Fluoreszenzmessung dargestellt. Nach dem Fura-2-Imaging und der DCF-Radikalmessung wird die Methodik zur Bestimmung der Zellviabilität mittels BCECF-Fluoreszenzmessung erklärt.

Für die Fluoreszenzmessungen mit Fura-2 AM (Fura-2-Acetoxymethyl Ester) zur Bestimmung der Calciumfreisetzung und zur Radikalmessung mittels DCF (2',7'-Dichlorofluorescein) wurden die Zellen auf vorgelatinierten runden Glascoverslips mit 25 mm Durchmesser in D2-Schälchen (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA) ausgesät. Die HUVECs wurden dann drei Tage in komplettem Nährmedium bei 37°C kultiviert, bis die Coverslips im Lichtmikroskop nachweislich zu 70-85% konfluent bewachsen waren.

2.3.1 Fura-2-Imaging

Die Calciummessungen erfolgten mittels der bei Tsien et al. beschriebenen Methode [70]. Als erstes wurden 50 µg Fura-2 AM (Molekular Probes, Leiden, Niederlande) in 50 µl Dimethylsulfid (DMSO; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) aufgelöst. Das in den D2-Schälchen befindliche Nährmedium wurde abgesaugt und mit 5 µl der Fura-2-Stocklösung in 1 ml PRMI pro D2 Schälchen für mindestens 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die Coverslips dem D2-Schälchen entnommen und in die Messkammer eingebaut. Als Messmedium in der Kammer diente HEPES mit 1,33 µmol/l CaCl_2 . Die Messkammer wurde in dem Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland) befestigt, in dem die Messung durchgeführt und computergestützt aufgezeichnet wurde.

Während eines Versuchs treten Fura-2 und Calcium in Kontakt und es kommt zur Komplexbildung der beiden Stoffe. Dieser Komplex wird bei den Wellenlängen 340 nm und 380 nm zur Fluoreszenz angeregt und bei einer Wellenlänge von 510 nm gemessen.

Die gemessenen Wellenlängen wurden so miteinander verrechnet, dass die erhaltenen Daten eine Ratio aus 340 nm und 380 nm darstellen. Die Erfassung und

Auswertung der gemessenen Daten erfolgte über das TILL Photonics Imaging System (TILL photonics, Martinsried, Deutschland).

Vor Beginn der Messung wurden die HUVECs je nach Versuch mit BAPTA (10 $\mu\text{mol/l}$), DPI (5 $\mu\text{mol/l}$), Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Simvastatin (5 $\mu\text{mol/l}$), bzw. Fluvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert und 5 Minuten nach Messbeginn mit 2,5 mmol/l Cyanid, bei einer Gesamtmessdauer von 35 Minuten, stimuliert.

Die beschriebene Methode ist bereits von anderen Forschungsgruppen erfolgreich zur Calciummessung verwendet worden [90].

2.3.2 2', 7'-Dichlorofluoresceinacetat-Radikalmessungen

Die zelluläre ROS-Bildung wurde durch die Fluoreszenzmessmethode mit DCF (2', 7'-Dichlorofluoresceinacetat) untersucht. Die HUVECs wurden mit einem Kulturmedium, welches 5 $\mu\text{mol/l}$ DCF enthielt, beladen. Nach einer Inkubationszeit von 15-20 Minuten wurde das Medium gewechselt. Das alte Medium wurde abgesaugt, die Coverslips entnommen und in eine temperaturkontrollierte Kammer eingebaut. Als Messmedium diente HEPES (1 ml/D2-Schälchen). Auch bei der ROS-Messung mit DPI wurden die Zellen, wie bei dem Fura-2-Imaging, vor Beginn der Messung je nach Versuch mit verschiedenen Stimulanzen inkubiert. Bei den DCF-Fluoreszenzmessungen waren dies: BAPTA (10 $\mu\text{mol/l}$), DPI (5 $\mu\text{mol/l}$), Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Simvastatin (5 $\mu\text{mol/l}$) Fluvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$).

Die fertige Kammer wurde in das Fluoreszenzmikroskop (IX 70, Olympus; Hamburg, Deutschland) eingebaut und die Messung gestartet. Fünf Minuten nach Messbeginn wurden die HUVECs mit 2,5 mmol/l Cyanid stimuliert.

Durch das in die Zellen diffundierte DCF-DA entsteht durch Anwesenheit von ROS das fluoreszierende DCF. Durch Radikalbildung kommt es bei einer angeregten Wellenlänge von 475 nm zu einer erhöhten Fluoreszenzintensität. Gemessen wird die Intensität des emittierten Lichts bei 512 nm.

Auch bei diesem Versuch wurde, wie bei dem Fura-2-Imaging, das TILL Photonics Imaging System zur computergesteuerten Datenerfassung und Auswertung verwendet.

Die Mittelwerte der verschiedenen Versuche bildeten die Grundlage für die Kurven der Abbildungen 5, 7, 8 und der Abbildungen 13 und 15.

2.3.3 Zellviabilität

Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mit Hilfe der BCECF-Fluoreszenzfärbung (2',7'-bis-Carboxyethyl-5',6'-carboxyfluorescein) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) bestimmt.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von 5000 Zellen pro cm^2 auf 24-Well Platten ausgesät. Nach einer 24-stündigen Wachstumsdauer erfolgte ein Mediumwechsel; die HUVEC wurden für 23 Stunden in ein serumfreies Medium umgesetzt. Nach dieser Zeitspanne wurden die HUVECs für 60 Minuten mit 5 $\mu\text{mol/l}$ BCECF beladen. Anschließend wurden die humanen Endothelzellen in HEPES-Pufferlösung mit den verschiedenen Statinen, Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Simvastatin (5 $\mu\text{mol/l}$) und Fluvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$), für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten eine nicht stimulierte Versuchsgruppe und als Positivkontrolle eine mit 0,001 % Wasserstoffperoxid (H_2O_2) inkubierte Zellreihe. Nach der Stimulation wurde der Überstand in eine zellfreie 24-Well Platte übertragen und anschließend die BCECF-Fluoreszenzmessung mittels GENios plate Reader (Tecan, Wien, Österreich) durchgeführt.

Die ausgewerteten Daten sind in Prozent zur nicht stimulierten Kontrollgruppe angegeben. Die Positivkontrolle mit 0,001% H_2O_2 diente bei diesem Versuch als Vergleichsgruppe für den herbeigeführten Zelltod [91].

2.4 Chemikalien

Der folgende Abschnitt zeigt eine Liste aller verwendeten Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge und Herstellerangaben.

A

- Allopurinol (Allo) Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- N-Acetylcystein (ACC) Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Acetylsalicylsäure (ASS) Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- Antikörper gegen von Willebrand-Faktor Dakopatts GmbH, Hamburg, Deutschland

B

- 1,2-Bis(o-aminophenoxy)Ethan-
N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA-AM) Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- (*human*) *basic Fibroblast Factor*
(hbFGF-0,5) Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
- BCECF (2',7'-bis-Carboxy-
ethyl-5',6'-carboxyfluorescein) Molecular Probes, Leiden, Niederlande

C

- Cyanid (CN) Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- Cerivastatin (Ceri) Bayer, Wuppertal, Deutschland
- CyQuant-Reagenz Molecular Probes, Leiden, Niederlande

D

- 2',7' Dichlodihydrofluorescein (DCF) Molecular Probes, Leiden, Niederlande
- Diphenyleneiodonium (DPI) Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
- Dimethylsulfid (DMSO) Sigma, Deisenhofen, Deutschland

E

- *Endothelial Cell Growth Supplement*
/ Heparin (ECGS/H) Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
- *Endothelial Basal Medium* (EBM) Promo Cell, Heidelberg, Deutschland

Material und Methoden

• (Human) Epidermal Growth Factor (hEGF)	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
F	
• Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Linz, Österreich
• Fluvastatin (Flu)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
• Fura-2-Acetoxymethyl Ester (Fura-2-AM)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
G	
• Gentamicin	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
• Gelatine	Serva, Heidelberg, Deutschland
H	
• H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
• HEPES	PAA, Linz, Österreich
• Hydrocortison (HC)	Promo Cell, Heidelberg, Deutschland
• HBSS (<i>Hanks` Balanced Salt Solution</i>)	PAA, Linz, Österreich
K	
• Kollagenlösung	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
L	
• N-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
M	
• Mevalonat (Mev)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
N	
• Nitrogen	(siehe Stickstoff)
S	
• Simvastatin (Sim)	Calbiochem, Bad Soden, Deutschland
• Stickstoff (N ₂)	Messer Griesheim GmbH, Oberhausen, Deutschland
T	
• Trypsin-EDTA	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Z	
• Ziege-Anti-Kaninchen-FITC	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.5 Statistik

Die dargestellten Daten sind grundsätzlich Ergebnisse aus Mittelwerten mehrerer Messreihen, die mit verschiedenen Zellpräparationen durchgeführt wurden. Zudem ist der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde durch den ANOVA-Test und einen anschließenden post-hoc Tuckey-Test ermittelt, wobei Unterschiede von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurden. Die statistische Bearbeitung erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms SPSS für Windows (Version 12.0).

3. Ergebnisse

Das folgende Kapitel zeigt die Ergebnisse der im zweiten Kapitel (Material und Methoden) beschriebenen Versuche. In 3.1 werden die Daten zur cyanidinduzierten endothelialen Proliferation, in 3.2 die Interaktion zwischen cyanidinduziertem Calcium und ROS und in 3.3 der Effekt von Statinen auf die cyanidinduzierte endotheliale Proliferation dargestellt. Der Abschnitt 3.4 zeigt schließlich die Wirkung der Statine auf die Calciumausschüttung und ROS-Bildung.

3.1 Cyanidinduzierte Endothelzellproliferation

Der folgende Abschnitt stellt die Ergebnisse der Zellzählungen zur Untersuchung der cyanidinduzierten Proliferation dar. Nach dem Vergleich der cyanid- mit der stickstoffinduzierten Proliferation werden die Ergebnisse der Versuche mit BAPTA und ACC erläutert. Es folgen die Resultate der Untersuchung zur ROS-Bildung.

3.1.1 Die cyanidinduzierte Proliferation im Vergleich zu der stickstoffinduzierten Proliferation

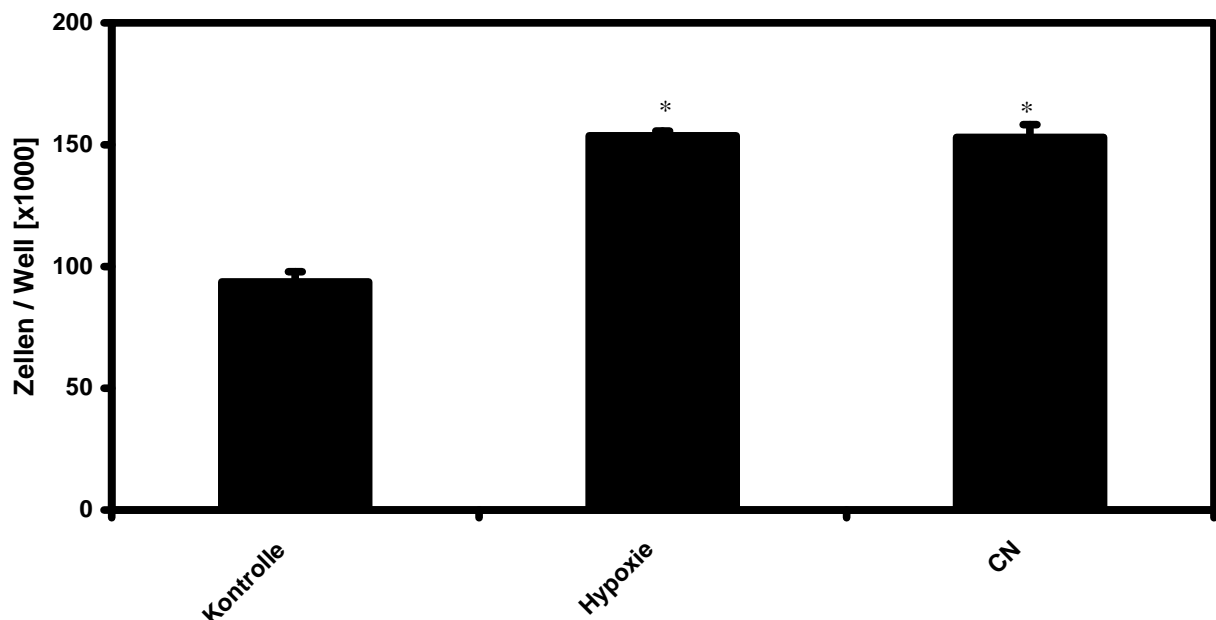


Abbildung 1: CN (2,5 mmol/l) -induzierte Proliferation im Vergleich mit der durch 100% N₂ verursachten Hypoxie. Zur Bestimmung der HUVECs-Proliferation wurde das Verfahren der Zellzählung verwendet. Die gezeigten Daten beruhen auf der Zahl der Zellen pro Kulturschälchen (n=10;*p<0.01 versus Kontrolle).

Ergebnisse

Um zu testen, ob Cyanid (2,5 mmol/l) in der Lage ist, eine adäquate transiente Hypoxie zu erzeugen, wurden HUVECs 60 Minuten mit Cyanid stimuliert und zum Vergleich HUVECs mit 100% N₂ begast. Die Proliferation der HUVECs wurde durch Zellzählung ermittelt. Die gezeigten Daten repräsentieren die Zahl der Zellen pro Kulturschälchen +/- SEM. In Abbildung 1 ist die gemessene Proliferation nach den beiden Versuchen dargestellt. Unter beiden Bedingungen kam es zu einer signifikanten Veränderung im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen der Kontrollgruppe (im Folgenden werden alle nicht stimulierten HUVECs, sofern nicht anders definiert, als Kontrollgruppe bezeichnet).

3.1.2 Einfluss von Calcium auf die cyanidinduzierte Proliferation

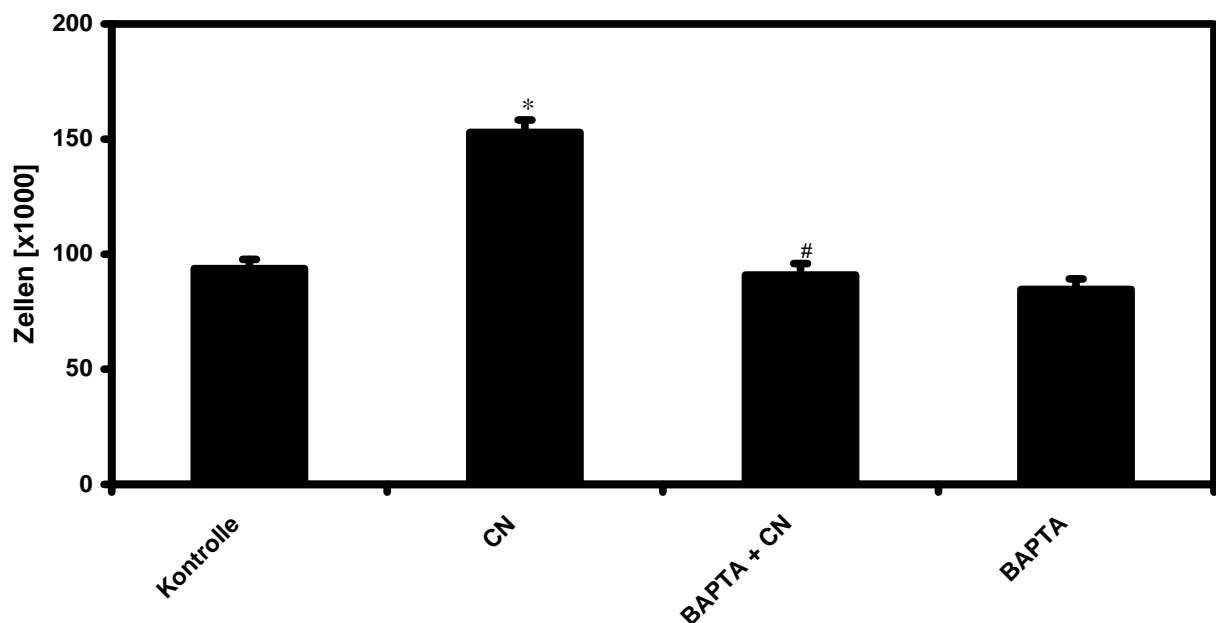


Abbildung 2: CN (2,5 mmol/l) -induzierte Proliferation in Abhängigkeit von Calcium. Die mit der Zellzählung ermittelte CN-induzierte Proliferation wird signifikant durch die Anwesenheit des Calciumchelators BAPTA (10 µmol/l) reduziert (n=10; *p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle; # p<0,01 versus CN).

Die Rolle von Calcium bei der cyanidinduzierten Proliferation wurde mittels eines Calciumchelators BAPTA/AM (BAPTA: 10 µmol/l) ermittelt. Die durchgeführte Zellzählung ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den nur mit Cyanid behandelten und den sowohl mit Cyanid als auch mit BAPTA inkubierten Zellen.

Ergebnisse

Dass die Proliferation der HUVECs mit BAPTA inhibiert werden kann, bedeutet, dass der proliferative Effekt von Cyanid Calcium-abhängig ist. In Bezug auf die als 100% Wachstum festgesetzte Kontrollgruppe ergeben die Daten der Zellzählung bei den mit Cyanid behandelten Zellen ein Wachstum von 163,2 % und bei Zellen, die neben der Cyanidinkubation mit BAPTA coinkubiert wurden, ein Wachstum von 97,1 % (Abbildung 2). Die dargestellten Daten repräsentieren das Mittel \pm SEM der stimulierten HUVECs.

3.1.3 Einfluss der *Reaktive Oxygen Species* auf die cyanidinduzierte Proliferation

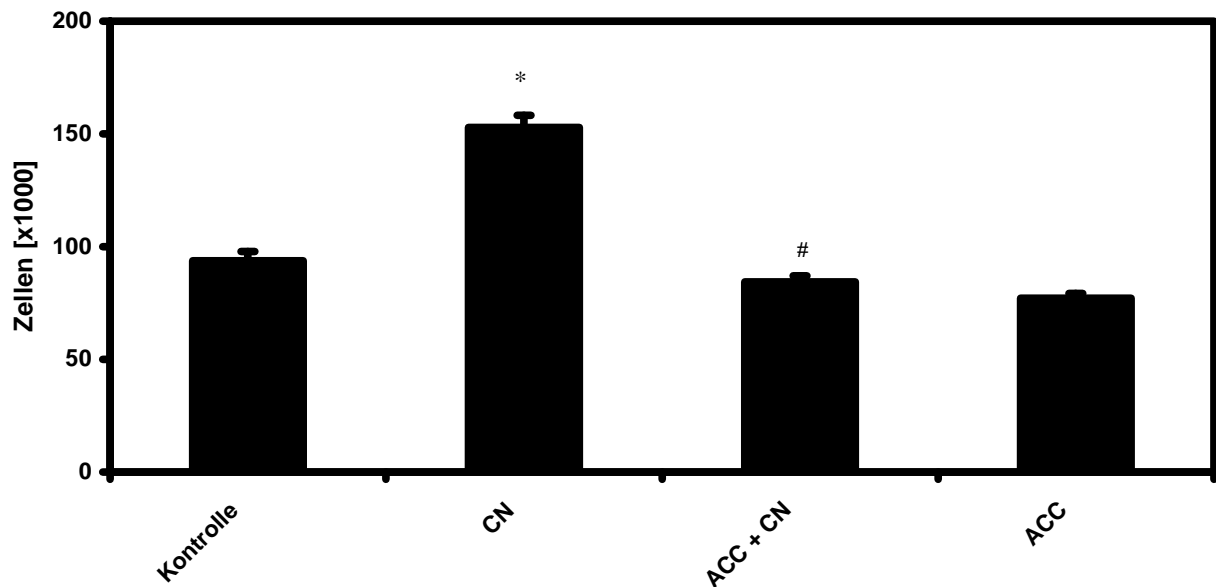


Abbildung 3: CN (2,5 mmol/l) -induzierte Proliferation in Abhängigkeit von der ROS-Bildung. Die mit einer Zellzählung ermittelte CN-induzierte Proliferation wird signifikant durch die Anwesenheit des ROS-Scavenger ACC (1mmol/l) reduziert (n=10; *p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle; # p<0,01 versus CN).

Eine weitere Zellzählung wurde durchgeführt, um die Beteiligung von ROS in cyanid-induzierter Proliferation nachzuweisen. Mit Substitution des ROS-Scavenger (=„Radikalfänger“) ACC (1 mmol/l) konnte eine ROS-Abhängigkeit gezeigt werden. Es besteht eine Signifikanz zwischen den nur mit Cyanid inkubierten Zellen und den Zellen, die mit Cyanid und ACC behandelt wurden. Durch den mit ACC durchgeführten Versuch konnte eine Radikalabhängigkeit der cyanidinduzierten

Ergebnisse

Proliferation nachgewiesen werden. Bezogen auf die auf 100% gesetzte Kontrolle, zeigte sich bei der Cyanid-Zellgruppe 163,2% und bei Cyanid und ACC 90,1%, (n=10; * p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle; # p<0,01 verglichen mit nur durch Cyanid stimulierten Zellen).

3.1.4 Die Bedeutung der Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase für die cyanidinduzierte Proliferation

Durch Inhibierung der wichtigen Radikal-produzierenden Enzyme der Endothelzellen konnte das relevante Enzym identifiziert werden, welches für die cyanidinduzierte Proliferation verantwortlich ist. Hierbei wurden die Radikal-produzierenden Enzyme NAD(P)H-Oxidase, Xanthin-Oxidase, Cyclooxygenase und eNOS (*endothelial NO-synthase*) untersucht.

Zur Inhibierung der NAD(P)H-Oxidase und der eNOS diene DPI. Die eNOS allein wurde durch N-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), die Xanthin-Oxidase durch Allopurinol (Allo), die Cyclooxygenase durch Acetylsalicylsäure (ASS) geblockt.

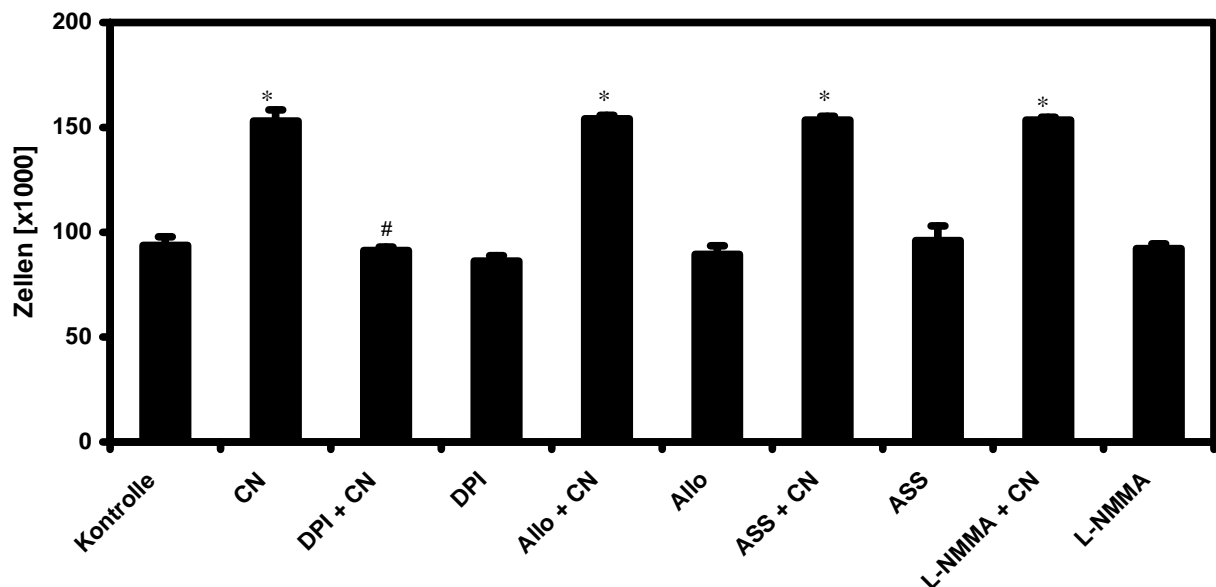


Abbildung 4: Einfluss verschiedener Inhibitoren ROS-produzierender Enzyme auf CN (2,5 mmol/l)-abhängige endotheliale Proliferation: DPI (5 µmol/l, NAD(P)H-Oxidase +eNOS), Allo (500 µmol/l, Xanthin-Oxidase), ASS (100 µmol/l, Cyclooxygenase), L-NMMA (300 µmol/l, eNOS). Die Ergebnisse sind gemittelt \pm SEM (n=10; *p<0,01 versus die Kontrolle; # p<0,01 versus CN).

Nur DPI (5 $\mu\text{mol/l}$), kein anderer Inhibitor der getesteten Endothelzellradikalproduzierenden Enzyme, war in der Lage, das cyanidabhängige endotheliale Zellwachstum zu hemmen. Keine Signifikanz im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Cyanid zeigten die Hemmstoffe L-NMMA, Allopurinol und ASS bei Coinkubation mit Cyanid. Da DPI sowohl die NAD(P)H-Oxidase als auch die eNOS hemmt, war es von Bedeutung, den gleichen Versuch mit L-NMMA durchzuführen, das nur die eNOS inhibiert. Die Versuche haben die NAD(P)H-Oxidase als existenzielle Radikalquelle für die cyanidinduzierte Proliferation identifiziert, da nur DPI, nicht aber L-NMMA die Radikalbildung unterdrücken konnte.

Die mitogene Zellantwort in Bezug auf die Kontrolle in Prozent: 163,2% (CN), 97,3% (CN+DPI), 164,5% (CN+Allo; 500 $\mu\text{mol/l}$), 163% (CN+ASS; 100 $\mu\text{mol/l}$), 163,8% (CN+L-NMMA; 300 $\mu\text{mol/l}$) (Abbildung 4).

3.2 Die Interaktion von cyanidinduziertem Calcium und *Reaktive Oxygen Species*

In dem vorangegangenen Teilabschnitt wurden die Resultate über den Einfluss der ROS-Bildung und Calciumausschüttung auf die cyanidinduzierte Proliferation dargestellt. Der folgende Abschnitt zeigt die Ergebnisse der DCF- und Fura-2-Fluoreszenzmessungen.

3.2.1 Wirkung von Cyanid und BAPTA auf die endotheliale *Reaktive Oxygen Species*-Bildung

Die Fluoreszenzmessung mit DCF zeigte bei Cyanid-Gabe (2,5 mmol/l) zunächst einen steilen Anstieg, der nach einem Maximum bei ca. 10 Minuten nach Versuchsbeginn in eine etwas schwächere, stetige Aufwärtsbewegung übergeht. Die Kurve verläuft bis zum Versuchsende aufsteigend. Nach vorheriger Gabe von BAPTA (10 $\mu\text{mol/l}$) reagierten die HUVECs bei Cyanid-Substitution mit einem im Vergleich zur reinen Cyanid-Stimulation flacheren Anstieg zum Beginn der Messung. Der Kurvenverlauf zeigt im Allgemeinen eine geringere Steigung und eine niedrigere Amplitude (Abbildung 5).

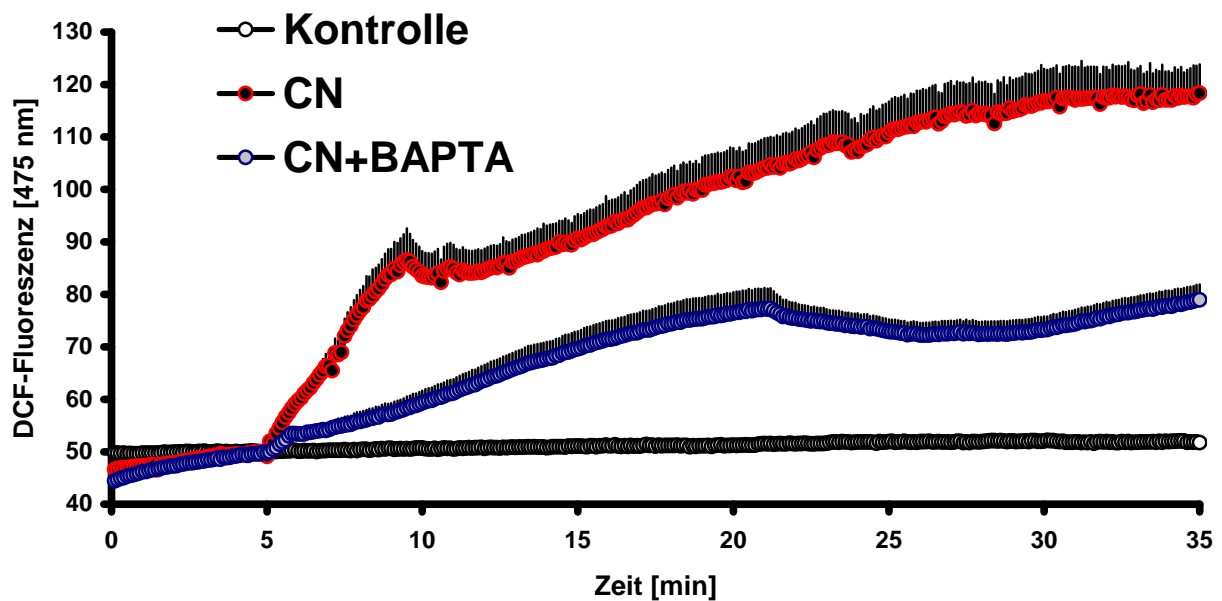


Abbildung 5: Im Vergleich zur Kontrolle zeigten CN (2,5 mmol/l) und auch CN +BAPTA (10 μ mol/l) eine erhöhte DCF-Fluoreszenzintensität. Die CN-induzierte Radikalbildung konnte durch Coinkubation mit dem Calciumchelator BAPTA signifikant reduziert werden.

Der Vergleich der beiden Fluoreszenzintensitätsmessungen zum Zeitpunkt $t=35$ Minuten nach Versuchsbeginn zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen den cyanidinduzierten HUVECs und der Kontrollgruppe. Eine Signifikanz besteht ebenfalls zwischen den mit Cyanid inkubierten Endothelzellen und den vor Cyanid-Gabe mit BAPTA stimulierten Zellen. Der cyanidinduzierte Radikalanstieg ist calciumabhängig, weil der ROS-Anstieg durch den Calciumchelator BAPTA gehemmt werden konnte ($n=30$; $*p<0,01$ gegen die Kontrolle; $^{\#}p<0,01$ gegen CN) (Abbildung 6).

Cyanid (2,5 mmol/l) bewirkt sowohl einen intrazellulären Calciumanstieg als auch eine Erhöhung des ROS. Calcium konnte hierbei eindeutig als Quelle für die cyanid-induzierte Radikalbildung identifiziert werden, da der ROS-Anstieg durch den Calciumchelator BAPTA (10 μ mol/l) reduziert wird.

Ergebnisse

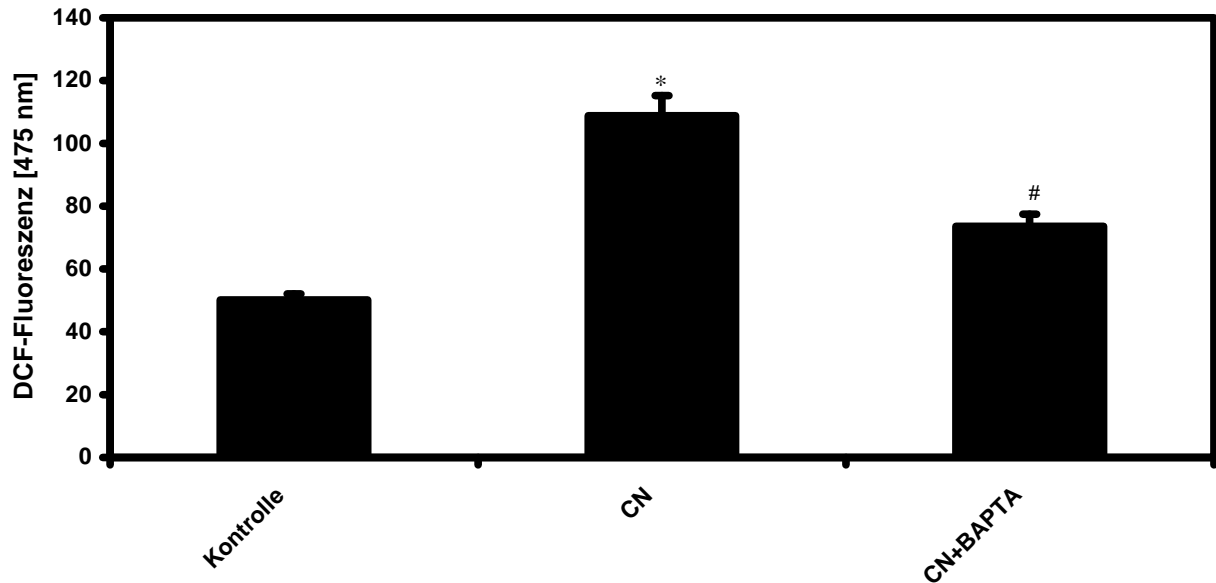


Abbildung 6: Vergleich der DCF-Fluoreszenz-Intensität 30 Minuten nach CN-Gabe (2,5 mmol/l). Es besteht eine Signifikanz zwischen der Kontrollgruppe und CN sowie auch zwischen den Versuchsgruppen CN und CN+BAPTA (10 μ mol/l) (n=30; *p<0,01 versus Kontrolle; #p<0,01 versus CN).

3.2.2 Fura-2-Ratio: Der Einfluss von Diphenyleneiodonium auf den cyanidinduzierten Calciumanstieg

In der Calciummessung mit Fura-2-Ratio ist zu erkennen, dass die Substitution von Cyanid nach 5 Minuten zu einer signifikanten Steigerung der Calciumausschüttung führt. Das Calciummaximum liegt hierbei nach einem steilen Anstieg direkt nach der Stimulation zwischen 10 und 12 Minuten der Gesamtmessdauer. Auf das Maximum der Calciumausschüttung folgt eine flache Rückbildungsphase (Abbildung 7). Auch durch Substitution des NAD(P)H- Inhibitors DPI (Diphenyleneiodonium) kommt es nach Zugabe von Cyanid zuerst zu einem steilen Anstieg mit Höchstwerten im Zeitraum zwischen 10 und 12 Minuten, worauf wiederum ein flacher Kurvenverlauf folgt (Abbildung 8).

Ergebnisse

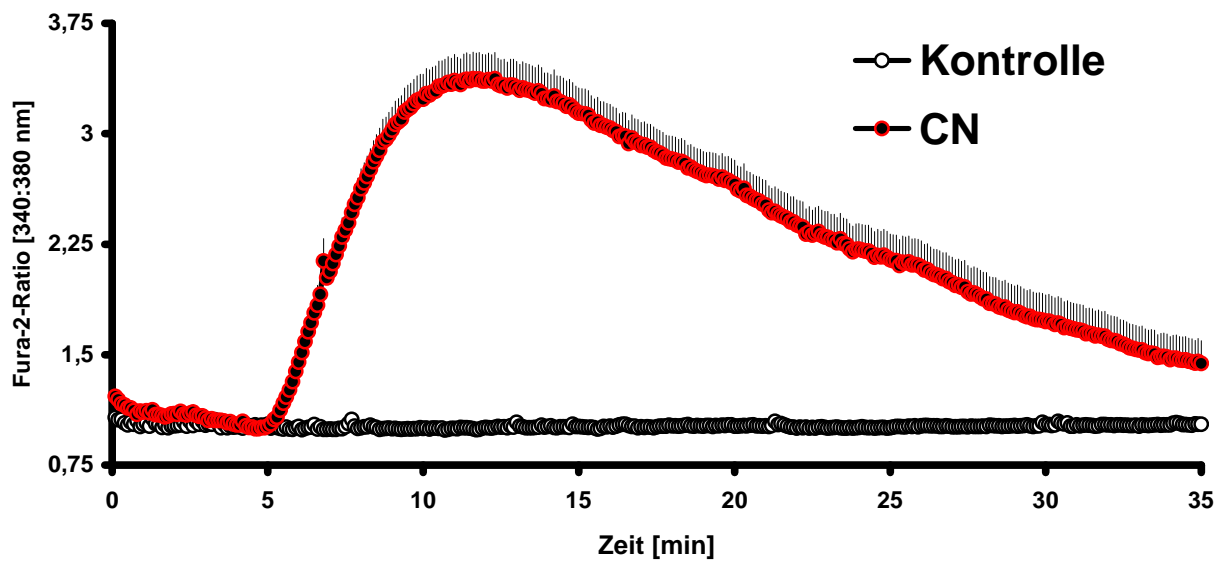


Abbildung 7: Der Effekt von CN (2,5 mmol/l) auf Endothelzellen zeigt im Vergleich zur Kontrolle einen erhöhten Calciumanstieg. Nach einem schnellen Erreichen des Maximums ca. 10 Minuten nach Versuchbeginn (5 Minuten nach CN Gabe) fällt die Calciumausschüttung langsam wieder ab.

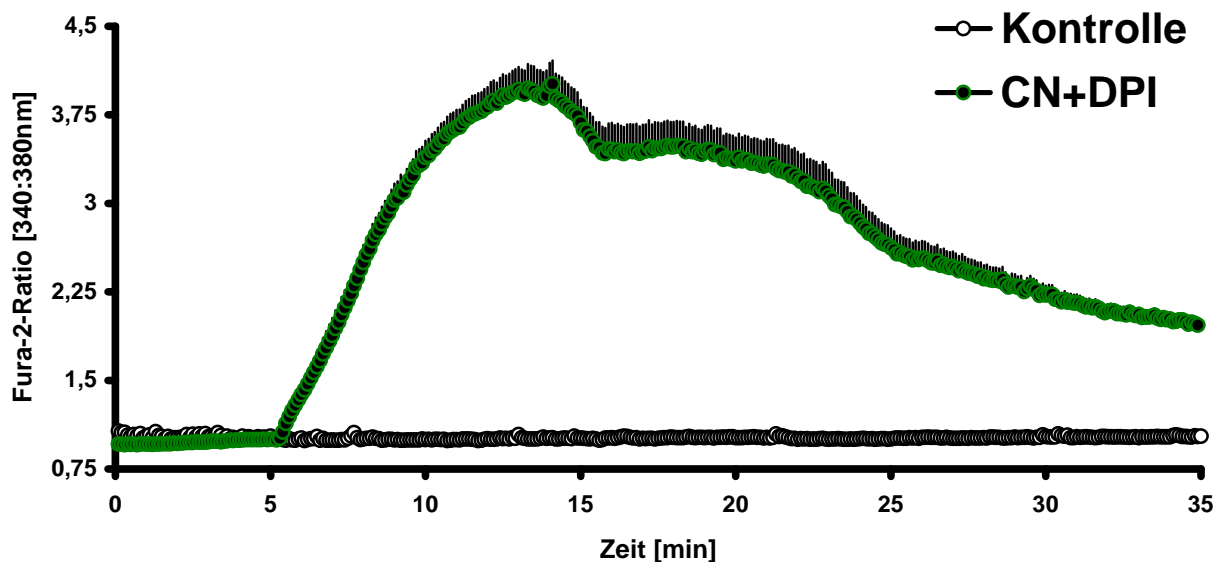


Abbildung 8: Durch CN (2,5 mmol/l) verursachter Calciumanstieg bei zusätzlicher Gabe von DPI (5 μ mol/l).

Beim Vergleich der beiden Versuche zum Zeitpunkt $t=10$ Minuten ist bei den nur mit Cyanid stimulierten Zellen gegenüber der Kontrolle eine Signifikanz nachweisbar.

Ergebnisse

Auch die Zellen, die sowohl mit Cyanid als auch mit DPI angeregt wurden, zeigen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Signifikanz. Kein signifikanter Unterschied besteht hingegen zwischen den mit Cyanid und DPI inkubierten Zellen gegenüber den nur mit Cyanid behandelten (Abbildung 9).

Der cyanidinduzierte Calciumanstieg konnte nicht durch das Blockieren der ROS mittels DPI (5 $\mu\text{mol/l}$) beeinflusst werden (Abbildungen 7 bis 9).

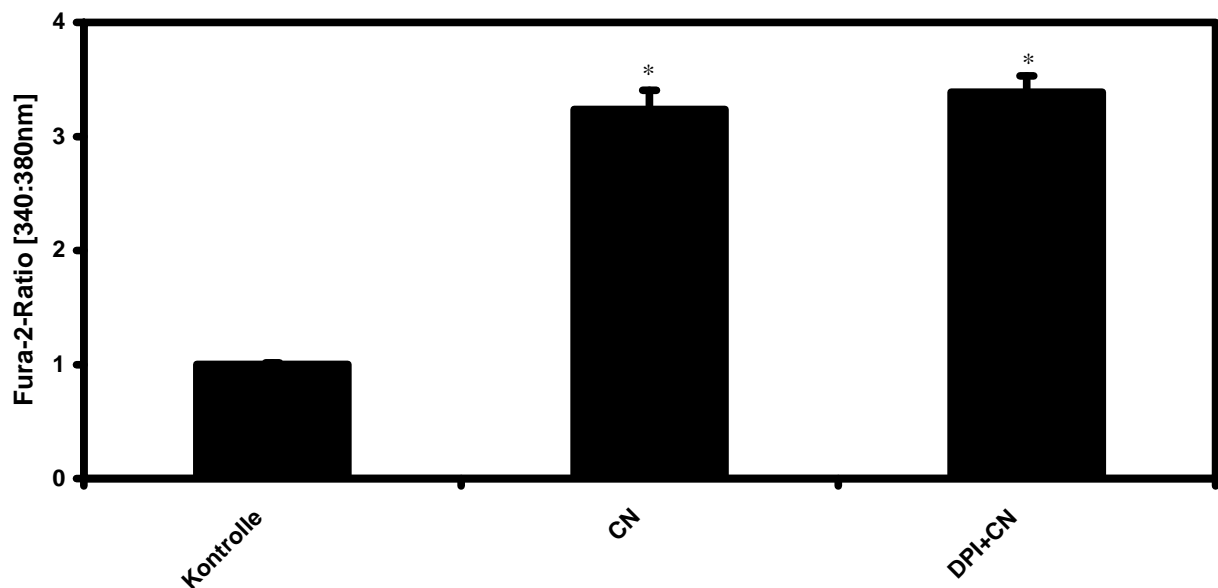


Abbildung 9: Sowohl die Stimulierung der HUVECs mit CN (2,5 mmol/l) allein als auch mit CN bei vorheriger Gabe des NAD(P)H-Inhibitors DPI (5 $\mu\text{mol/l}$) zeigen bei der Calciummessung, verglichen zum Zeitpunkt $t=10$ Minuten, im Vergleich zur Kontrolle eine Signifikanz auf. Es ist keine Signifikanz zwischen CN und CN+DPI nachweisbar ($n=30$; $*p<0,01$ im Vergleich zur Kontrolle).

3.3 Der Effekt der Statine auf die cyanidinduzierte endotheliale Proliferation

Im Folgenden werden die Ergebnisse über der Wirkung der Statine auf die durch Cyanid hervorgerufene Endothelzellproliferation dargestellt. Die Proliferationsmessungen wurden mittels Zellzählungen, die Messung der Zellviabilität mit Hilfe von BCECF-Fluoreszenzversuchen und durch die Quantifizierung der DNA-Synthese mittels CyQuant-Assay durchgeführt.

3.3.1 Der konzentrationsabhängige Effekt der Statine auf die cyanidinduzierte Proliferation

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Statine die Endothelzellproliferation konzentrationsabhängig inhibieren [78]. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu zeigen, ob Cerivastatin (0,1 mmol/l), Simvastatin (5 mmol/l) und Fluvastatin (2,5 mmol/l) eine cyanidinduzierte endotheliale Proliferation verhindern. Die Zellzählung zeigte, dass die Statin- und Cyanid-inkubierten Zellen im Vergleich zu der Zellgruppe, die nur mit Cyanid stimuliert war, eine signifikante Proliferationshemmung induzieren. Diese Wachstumsinhibierung ist abhängig von der Statinkonzentration. Wie bereits in Abbildung 4 gezeigt, reduzierte jedes der Statine signifikant die mitogene Antwort auf Cyanid.

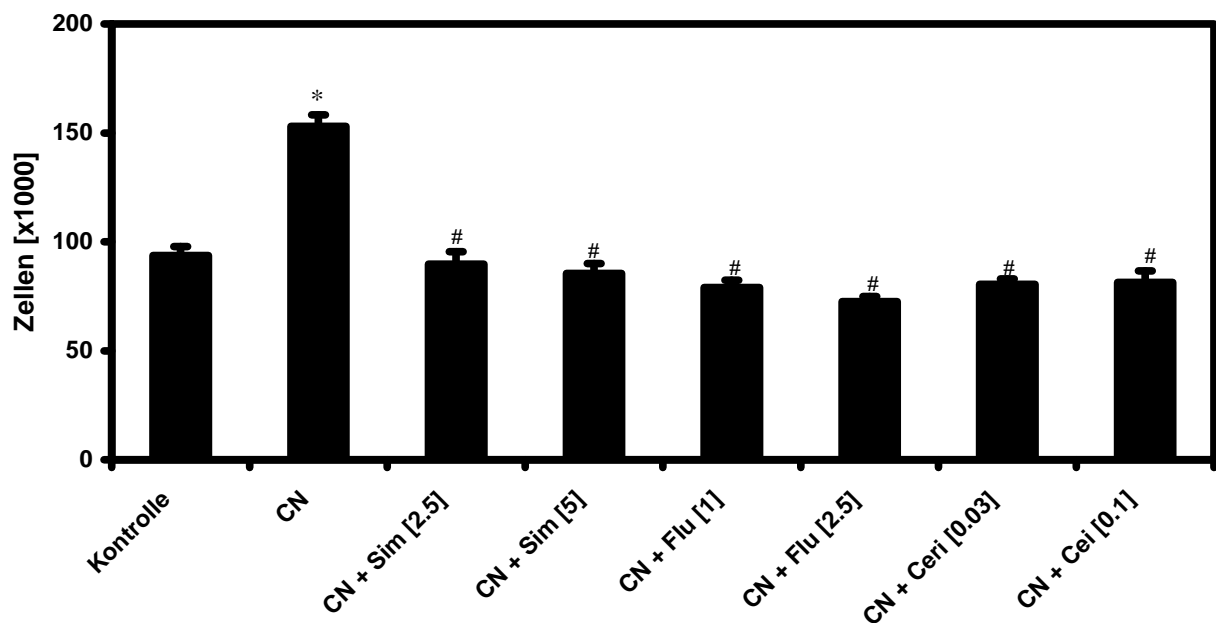


Abbildung 10: Statine inhibieren abhängig von ihrer Konzentration die CN-induzierte Proliferation. Die Daten repräsentieren die Zellzahlen, je Kulturschälchen, stimuliert mit CN (2,5 mmol/L), Cerivastatin (Ceri) (0,1 µmol/l), Fluvastatin (Flu) (2,5 µmol/l), Simvastatin (Sim) (5 µmol/l) (n=10; * p<0,01 versus Kontrolle; # p<0,01 versus CN).

3.3.2 Einfluss der Statine auf die Zellviabilität

Die Zelllebensrate wurde mit der Zugabe von BCECF, einem Marker für Zellintegrität, bestimmt. BCECF ist ein Marker, der sich in den Zellen befindet und nur ausgeschüttet wird, wenn die Zellen sterben. Die Stimulation mit H_2O_2 im Rahmen der Positivkontrolle zeigt einen signifikanten Anstieg der sterbenden Zellen. Im Vergleich zur Positivkontrolle ist bei den mit den Statinen behandelten Zellen keine gesteigerte BCECF gemessen worden. Es kommt durch Statin-Gabe zu keiner Änderung der Zellintegrität. Die Daten in Abbildung 11 sind in Prozent zur Kontrolle angegeben.

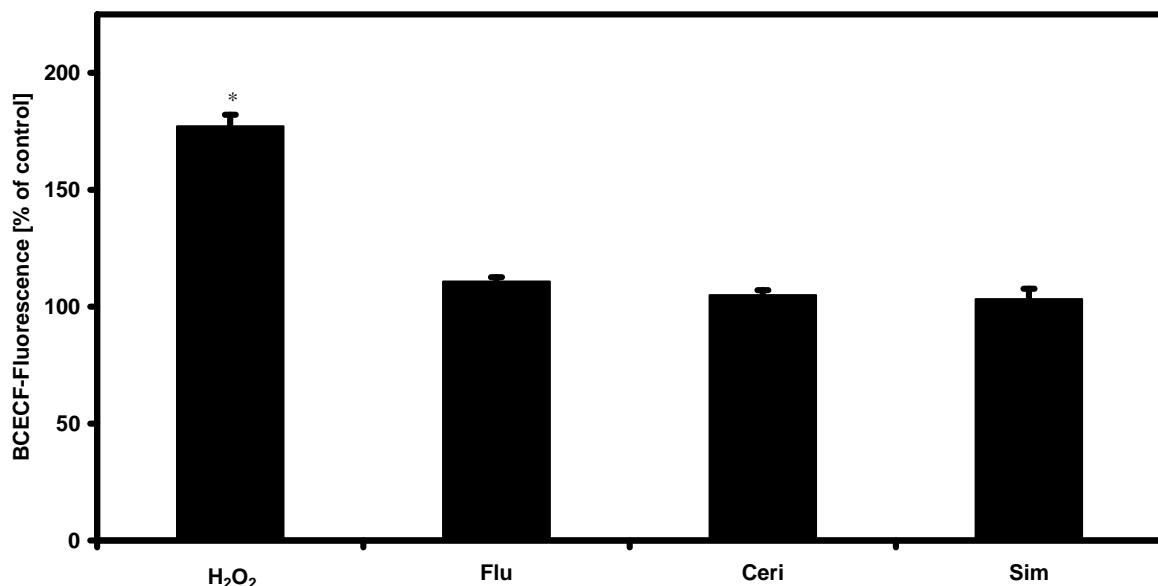


Abbildung 11: Die Zellviabilität wurde ermittelt durch die Quantifizierung der freigesetzten BCECF von sterbenden Zellen. Die Daten sind in Prozent bezogen auf die Kontrolle von 100% angegeben. H_2O_2 dient als eine Positivkontrolle für den Zelltod. (n=24, *p<0,001 versus Statine)

3.3.3 Wirkung von Mevalonat auf den proliferationshemmenden Statineffekt

Zur Quantifizierung der DNA-Synthese mittels des CyQuant-Assays wurden weitere Versuche mit Mevalonat (500 $\mu\text{mol/l}$) durchgeführt. Es ist zu erkennen, dass der durch Cyanid induzierte und mit Statinen geblockte Wachstumsanstieg der HUVECs durch Zugabe des HMG-CoA-Reduktase-Produktes Mevalonat negiert werden konnte. Auf diese Weise zeigen die mit Cyanid, Statinen und Mevalonat stimulierten

Ergebnisse

Endothelzellen eine Signifikanz gegenüber der jeweiligen Zellgruppe, die nur mit Cyanid und dem jeweiligen Statin inkubiert wurden.

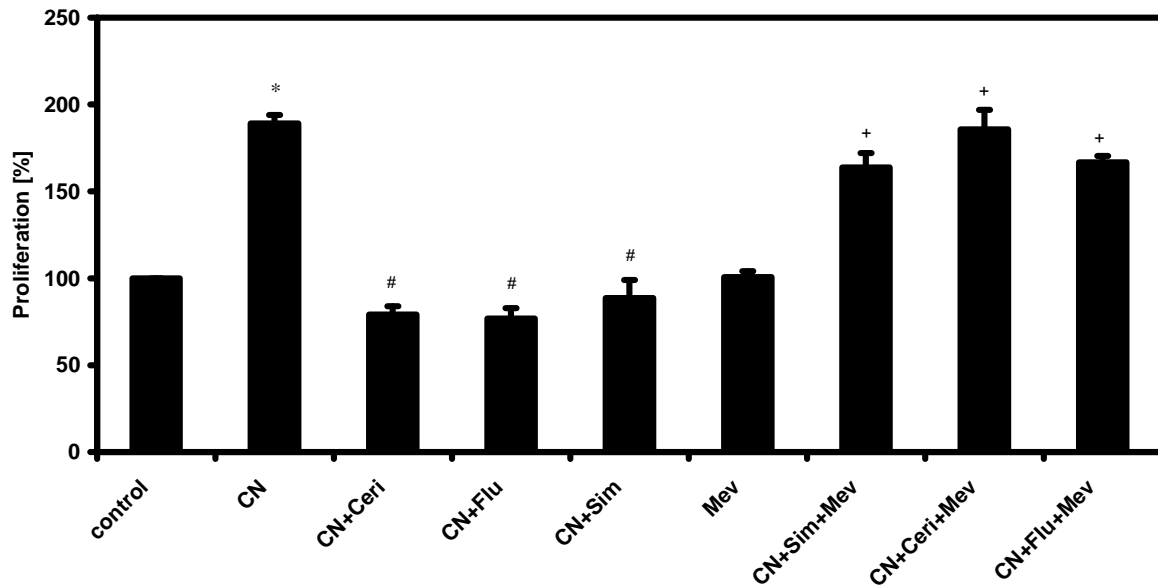


Abbildung 12: Quantifizierung der DNA-Synthese ermittelt durch CyQuant-Assay. Stimuliert wurde mit CN (2,5 mmol/l), Mevalonat (500 μ mol/l), Ceri (0,1 μ mol/L), Sim (5 μ mol/l), Flu (2,5 μ mol/l). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM in Prozent zur Kontrolle (n=6; *p<0,01 im Vergleich zur Kontrolle; #p<0,01 versus CN; +p<0,01 versus Statine mit CN).

3.4 Einfluss der Statine auf die durch Cyanid verursachte Calciumausschüttung und *Reaktive Oxygen Species*-Bildung

Durch die oben beschriebenen Versuche wurde gezeigt, dass der Effekt von Cyanid auf die HUVEC-Proliferation sowohl von einem Calciumeinstrom als auch von der ROS-Bildung abhängig ist. Es konnte dargestellt werden, dass die cyanidinduzierte Proliferation durch Statine inhibiert werden kann. Weitere Versuche wurden durchgeführt, um herauszufinden, ob auch der cyanidinduzierte Calciumeinstrom und ROS-Anstieg durch die Statine Cerivastatin, Fluvastatin und Simvastatin beeinflusst werden.

3.4.1 Einfluss der Statine auf die Calciumausschüttung

Die Fura-2-Messungen zeigten 10 Minuten nach Messbeginn bei simultaner Cyanid-Applikation, dass die mit Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$) stimulierten Zellen, die stärkste Abschwächung des Calciumanstieges erfahren. Weniger stark reagierten die mit Simvastatin (5 $\mu\text{mol/l}$) inkubierten Zellen, gefolgt von der Gruppe der mit Fluvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$) behandelten HUVECs. Dennoch wies jede Versuchsgruppe der mit Statinen inkubierten Zellen den cyanidinduzierten Calciumanstieg (Abbildung 13) auf.

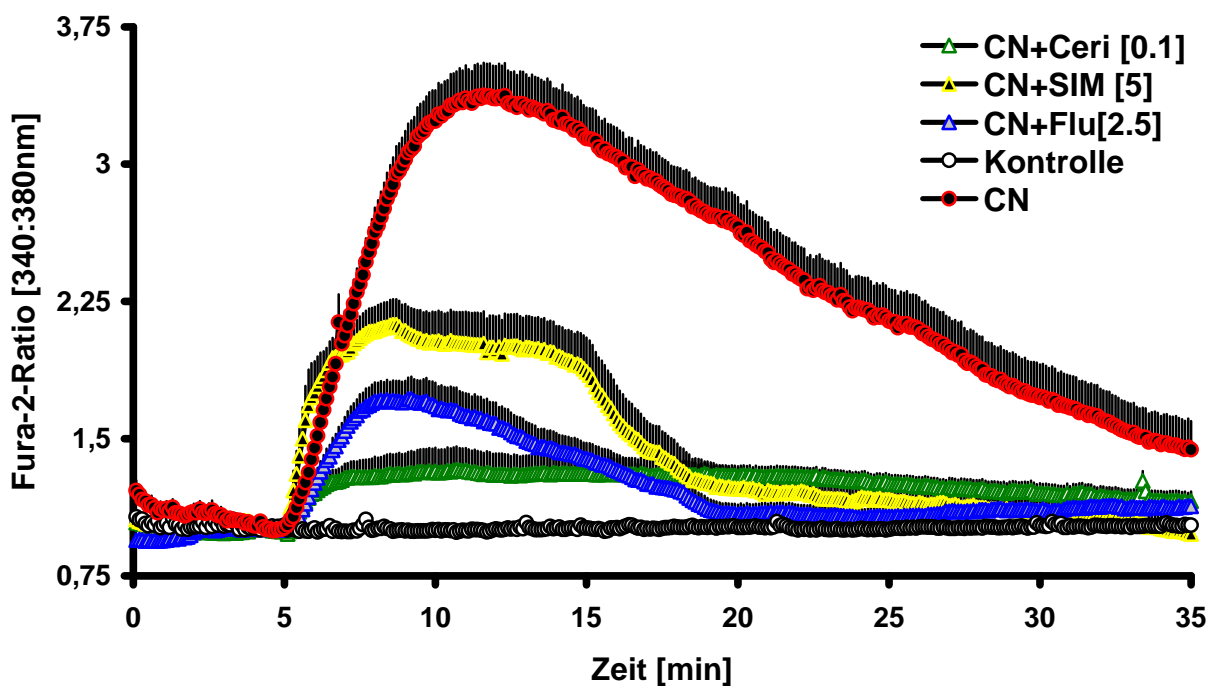


Abbildung 13: Der Effekt von Ceri (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Sim (5 $\mu\text{mol/l}$), Flu (2,5 $\mu\text{mol/l}$) auf das CN (2,5 mmol/l) induzierte Calciumniveau.

Abbildung 14 stellt den direkten Vergleich der Statinwirkung im Vergleich zu der alleinigen Cyanid-Wirkung dar. Alle untersuchten Statine, Cerivastatin, Simvastatin und Fluvastatin, zeigten beim Vergleich der Calciummessungen zum Zeitpunkt $t=10$ Minuten eine Signifikanz gegenüber den Zellen, die nur mit Cyanid stimuliert wurden.

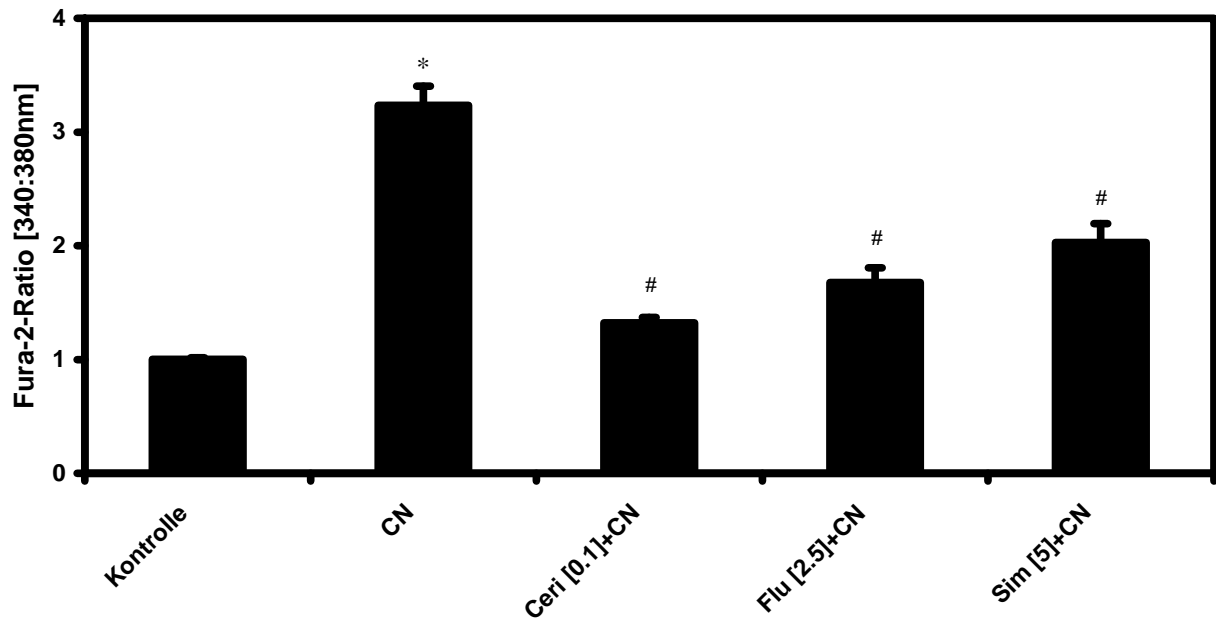


Abbildung 14: Vergleich der Statin-induzierten Effekte auf den CN-abhängigen Calciumanstieg 10 Minuten nach Start der Messung und 5 Minuten nach Applikation von CN (2,5 mmol/l). Ceri (0,1 $\mu\text{mol/l}$) zeigt den stärksten Effekt auf den Calciumanstieg, gefolgt von Flu (2,5 $\mu\text{mol/l}$) und Sim (5 $\mu\text{mol/l}$). (n=10; *p<0,01 versus die Kontrolle; #p<0,01 versus CN).

3.4.2 Einfluss der Statine auf die *Reaktive Oxygen Species*-Bildung

Die DCF-Fluoreszenzversuche zur Untersuchung der Effekte von Statinen auf die ROS-Bildung ergaben, dass alle Statine Einfluss auf die Radikalbildung nehmen. Die Statinstimulation vermindert den cyanidinduzierten Radikalanstieg über den gesamten Zeitraum der Messung (Abbildung 15). Beim direkten Vergleich der mit Statinen behandelten HUVECs mit den nur mit Cyanid (2,5 mmol/l) stimulierten Zellen zeigt sich zum Zeitpunkt t=35 Minuten (30 Minuten nach Cyanid-Applikation) eine Signifikanz bei Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Fluvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$) und Simvastatin (5 $\mu\text{mol/l}$) (Abbildungen 15 und 16).

Ergebnisse

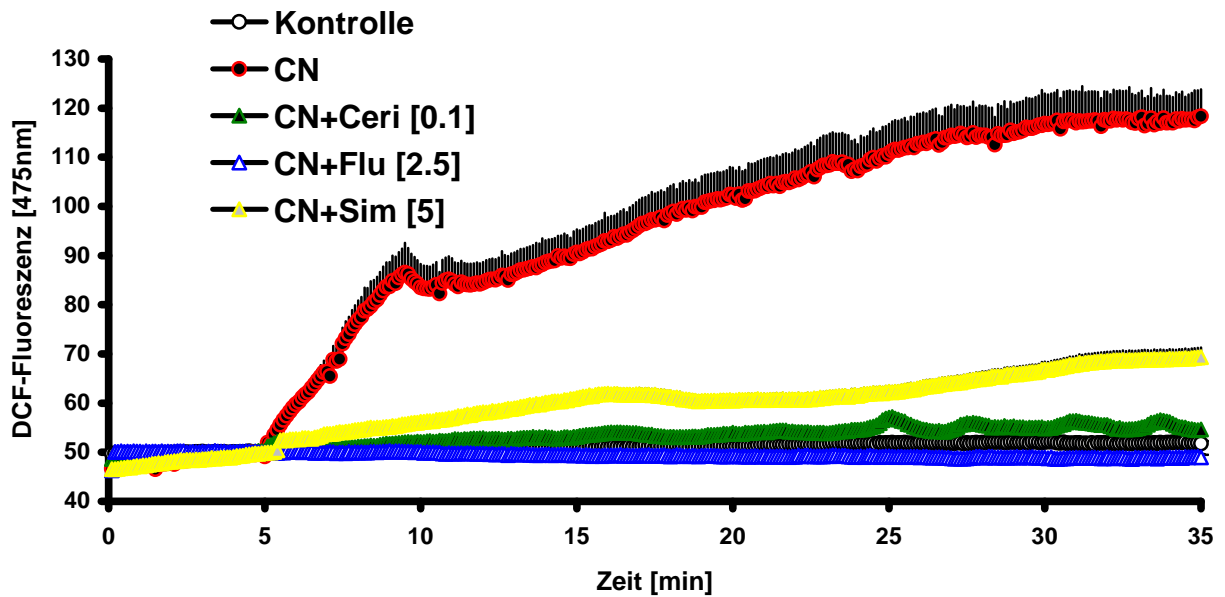


Abbildung 15: Der Effekt von Ceri (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Sim (5 $\mu\text{mol/l}$) und Flu (2,5 $\mu\text{mol/l}$) auf die durch CN (2,5 mmol/l) erzeugte ROS-Bildung.

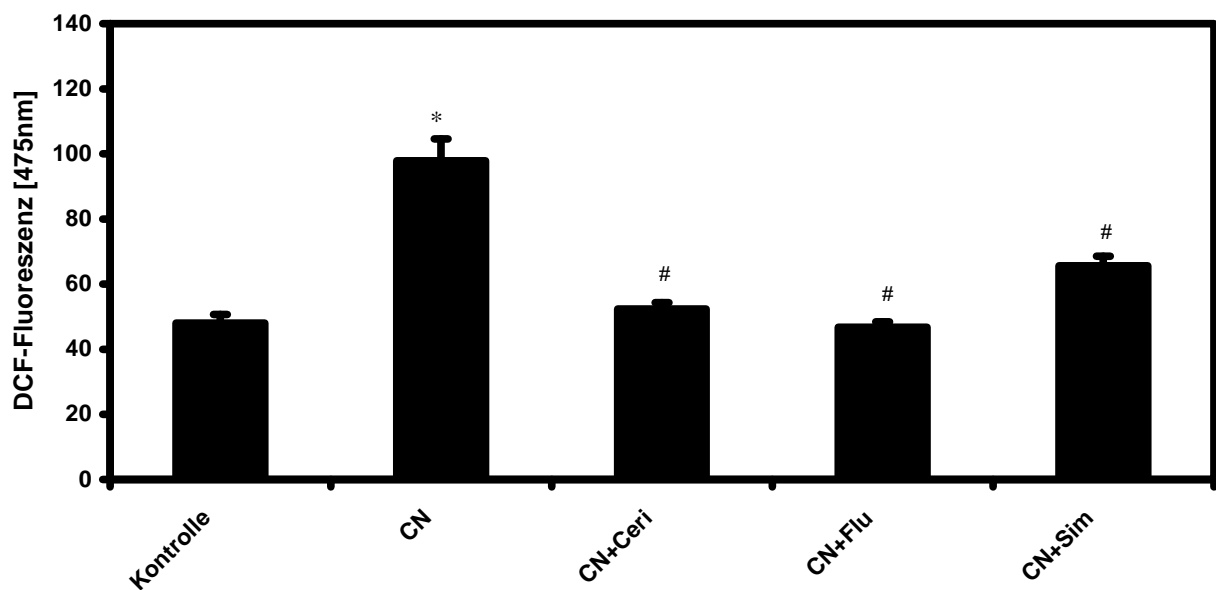


Abbildung 16: Vergleich der Statin-induzierten Effekte auf die CN-abhängige ROS-Bildung 30 Minuten nach CN (2,5 mmol/l) Applikation. Die Statine Ceri (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Sim (5 $\mu\text{mol/l}$) und Flu (2,5 $\mu\text{mol/l}$) hemmen alle signifikant gegenüber der CN Zellgruppe die Bildung von ROS. (n=10; *p<0,01 versus Kontrolle; # p<0,01 versus CN).

4. Diskussion

Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, welchen Effekt Statine auf die hypoxie-induzierte Proliferation menschlicher Endothelzellen haben. Als Modell für eine transiente Hypoxie diente Cyanid (CN), mit dem die HUVECs für kurze Zeit inkubiert wurden. Stellvertretend für die Gruppe der Statine wurden Cerivastatin, Fluvastatin und Simvastatin verwendet:

Es wurden die folgenden Resultate erzielt, die in den Abschnitten 4.1 bis 4.5 diskutiert werden:

1. Eine cyanidinduzierte Zellproliferation entspricht einer „realen“ Hypoxie mit 100% Stickstoff.
2. Die ausgelöste Hypoxie ist sowohl Calcium- als auch ROS-abhängig, wobei die ROS-Bildung durch Calcium induziert ist.
3. Der hypoxieinduzierte Calciumanstieg und die durch Hypoxie hervorgerufene Bildung von ROS sind signifikant durch Statine reduzierbar.
4. Eine durch Hypoxie ausgelöste mitogene Zellantwort der Endothelzellen ist komplett durch die Statine Cerivastatin, Fluvastatin und Simvastatin aufhebbar.

Zellen, die einer Hypoxie ausgesetzt werden, reagieren mit Proliferation. Diese Proliferation kann durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren, wie EGF, TGF- β , bFGF und VEGF, verursacht sein. Da in früheren Studien belegt wurde, dass hypoxieinduzierte Angiogenese auch ohne das Mitwirken von Wachstumsfaktoren möglich ist, ist es von Interesse, herauszufinden, welche anderen Faktoren bei einer hypoxieinduzierten Proliferation von HUVECs eine Rolle spielen [6] [7].

4.1 Cyanidinduzierte Proliferation der *Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells*

In der vorliegenden Studie diente die Inkubation mit Cyanid bei den beschriebenen Versuchen zur Induktion der Hypoxie. Zu Beginn wurden Versuche durchgeführt, die nachweisen sollten, dass Cyanid ein geeignetes Agens zur Erzeugung einer Hypoxie in HUVECs ist. Ein anderes Verfahren, die Inkubation von Zellen mit hundertprozentigem Stickstoff, hat sich bereits als Methode zur Induktion transienter Hypoxie in Endothelzellen bewährt [6] [7] [71] [72]. Die Perfusion mit 100% Stickstoff nutzten beispielsweise Schäfer et al. als Verfahren, um bei Endothelzellen der Schweineaorta eine Hypoxie zu erzeugen. Durch dieses Verfahren konnten die hypoxieinduzierten proliferativen Effekte von Endothelzellen aufgezeigt werden, die durch einen autonomen Antwortmechanismus ohne den Einfluss parakriner Effektoren, wie VEGF, auslösbar sind [6] [7]. Aus diesem Grund konnte das Verfahren der stickstoffinduzierten Hypoxie als Kontrolle zur Validierung der mittels Cyanid induzierten Hypoxie dienen.

Die Proliferationsmessungen der vergleichenden Experimente zwischen der cyanid-inkubierten und der mit 100% Stickstoff behandelten HUVECs ergeben eindeutige Ergebnisse. Abbildung 1 zeigt, dass zwischen den beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied besteht. Eine Proliferationszunahme auf mehr als 160% zeigte sich beim Vergleich der CN- bzw. 100% N₂-inkubierten HUVECs mit der Kontrollgruppe der nicht behandelten Endothelzellen. Darüber hinaus wurde Cyanid bereits in Versuchen mit anderen Zellreihen erfolgreich zur Induktion eines Hypoxiemodells genutzt [67] [68]. Aus den genannten Gründen stellte die Applikation von Cyanid ein adäquates Modell zur hypoxieassoziierten zellulären Signalgebung dar.

Zur näheren Untersuchung des ablaufenden Mechanismus der cyanidinduzierten endothelialen Proliferation wurden weitere Proliferationsmessungen durchgeführt. Nachfolgende Experimente sollten Hinweis darauf geben, ob es sich bei den intrazellulären Prozessen um reversible Vorgänge handelt.

So zeigte sich, dass Experimente mit dem Calciumchelator BAPTA einen Rückgang des proliferativen Cyanid-Effekts bewirkten. Die durchgeführten Zellzählungen (siehe Abbildung 2) ergaben einen signifikanten Unterschied zwischen den nur mit Cyanid behandelten und den sowohl mit Cyanid als auch mit BAPTA inkubierten Zellen. Die

Wirkung von BAPTA auf die Proliferation der HUVECs zeigt, dass der proliferative Effekt von Cyanid erstens verhindert werden kann und zweitens Calcium-abhängig ist.

Diese Ergebnisse entsprechen den in der Literatur beschriebenen Änderungen der Calciumkonzentration einer transienten Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung bei anderen Zellreihen [46] [47] [67] [86].

Um eine Radikalbeteiligung an der hypoxieinduzierten Proliferation zu untersuchen, wurden die HUVECs mit einem Radikalfänger stimuliert: Mit weiteren Zellzählungen konnte die Beteiligung von ROS an cyanidinduzierter Proliferation nachgewiesen werden. Die Substitution des „ROS-Scavenger“ (ROS-Fänger) ACC (1 mmol/l) zeigte eine Signifikanz zwischen den nur mit Cyanid inkubierten Zellen und den Zellen, die mit Cyanid und ACC behandelt wurden (siehe Abbildung 3).

Dies bedeutet, dass der mitogene Effekt von Cyanid auf humane Endothelzellen durch Hemmung der Calcium- und ROS- vermittelten Signalgebung aufgehoben werden kann. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Forschungsergebnissen an Tierendothelzellen der Arbeitsgruppe Schäfer et al. [6] [7]. Sie zeigte, dass bei Versuchen mit isolierten Endothelzellen der Schweineaorta eine hypoxieinduzierte Proliferationsantwort sowohl durch Calciuminhibierung als auch Hemmung der ROS-Bildung unterdrückt werden kann [6] [7].

4.2 Die Rolle der *Reaktive Oxygen Species*-Bildung und Calcium-ausschüttung in der hypoxieinduzierten Endothelzellproliferation

Um herauszufinden, welche radikalproduzierenden Enzyme für die cyanidinduzierte Proliferation verantwortlich sind, wurden verschiedene Enzyme durch die entsprechenden Inhibitoren bei gleichzeitiger Cyanid-Gabe blockiert und weitere Proliferationsmessungen durchgeführt.

Getestet wurden die radikalproduzierenden Enzyme Xanthin-Oxidase, welche durch Allopurinol antagonisiert wurde, die Cyclooxygenase, inhibiert durch ASS sowie die NAD(P)H-Oxidase und die eNOS, die beide durch DPI (5 $\mu\text{mol/l}$) gehemmt wurden. Zusätzlich wurde die eNOS separat durch den Inhibitor L-NMMA geblockt.

Gezeigt hat sich, dass nur DPI (5 $\mu\text{mol/l}$), der Hemmer der NAD(P)H-Oxidase und der eNOS, in der Lage war, das Cyanid-abhängige endotheliale Zellwachstum zu

hemmen. Da es jedoch bei der Blockade der eNOS allein mittels L-NMMA zu keiner signifikanten Proliferationshemmung kam, konnte die NAD(P)H-Oxidase als existenzielle Radikalquelle Cyanid-abhängiger ROS-Bildner identifiziert werden (siehe Abbildung 4).

Diese Ergebnisse entsprechen früheren Studien, die mit stickstoffinduzierter Hypoxie an Rinderpulmonalarterien, Endothelzellen der Schweineaorta und *Human Aortic Endothelial Cells* (HAEC) durchgeführt wurden [73] [7] [46].

Bei Wie et al. konnte in Rinderendothelzellen der Pulmonalarterie durch eine temporäre Ischämie über eine Stunde eine Zunahme der ROS-Bildung erzeugt werden. Auch hier konnte dieser Effekt auf die Radikalbildung der NAD(P)H-Oxidase zurückgeführt werden [73].

Versuche mit Endothelzellen der Schweineaorta zeigten eine Abhängigkeit der proliferativen Zellantwort auf Hypoxie vom MEK/ERK-Signaltransduktionsweg. Auch ein NAD(P)H-Oxidase-abhängiger Anstieg der Endothelzellproliferation konnte in dieser Tierzellstudie von Schäfer et al. nachgewiesen werden [7].

In der Signalabfolge wurde eine erhöhte ROS-Bildung sowohl vor dem MEK/ERK-Signaltransduktionsweg als auch danach beobachtet, wobei die ROS-Bildung der MEK/ERK vorgeschaltet in den Mitochondrien verursacht wird. Die Radikalsynthese, die der MEK/ERK nachgeschaltet ist, erfolgt durch die NAD(P)H-Oxidase [39] [75] [76]. Es ist davon auszugehen, dass die transiente Hypoxie von HUVECs zu einer mitochondrialen ROS-Bildung führt, die eine Aktivierung des MEK/ERK-Signaltransduktionsweges bewirkt. Durch die Aktivierung des MEK/ERK-Signaltransduktionsweges wiederum kommt es zur NAD(P)H-Oxidase-Aktivierung und zur weiteren ROS-Bildung. Allerdings wurde der genaue Mechanismus dieses komplizierten Systems bisher noch nicht hinreichend untersucht.

Auch ein Zusammenhang zwischen den durch die NAD(P)H-Oxidase erzeugten ROS und Calcium wurde bereits in früheren Studien in Erwägung gezogen. Hu et al. beschreiben die Reaktion nach Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung bei *Human Aortic Endothelial Cells* (HAEC). Bei Behandlung der Zellen konnte hier eine repetitive Veränderung der Calciumkonzentration gemessen werden, die von intrazellulärer Calciumfreisetzung abhängig ist. Zur Aufrechterhaltung des Calciumspiegels sei zusätzlich extrazelluläres Calcium erforderlich, wobei die Möglichkeit einer Initiierung der besagten Calciumkonzentration durch die NAD(P)H-Oxidase in Betracht gezogen wird [46].

Die vorliegende Studie zeigte in Versuchen mit Fura-2-Imaging, dass die Substitution von Cyanid nach 5 Minuten zu einer signifikanten Steigerung der Calciumausschüttung führt. Der in Abbildung 7 gezeigte Verlauf entspricht dem in der Literatur beschriebenen Calciumeffekt. Nach einem steilen Anstieg kommt es nach der Stimulation zwischen der 10. und 12. Minute nach Messbeginn zu einem Calciummaximum. In der Literatur wird dies als ein durch Hypoxie provozierte Calciumanstieg beschrieben, der sich, wie in Abbildung 7 zu sehen ist, bei nachfolgender Reoxygenierung langsam wieder auf einen normalen Calciumstand einstellt. Der Kurvenverlauf lässt sich damit erklären, dass ein durch transiente Hypoxie induzierter Calciumanstieg sowohl von intrazellulärer als auch von extrazellulärer Calciumausschüttung abhängig ist, da die Triggerung der Zelle in einer Ausschüttung der intrazellulären Calciumspeicher mit gleichzeitigem Calciumfluss von extrazellulär resultiert. Der flache Abfall der Calciumkurve liegt darin begründet, dass die internen Calciumspeicher sehr schnell erschöpft sind und speziell die extrazellulären Calciumspeicher benötigt sind, um eine länger bestehende Calciumerhöhung zu gewährleisten. Generell hält der Calciumeinstrom von extrazellulär nach Mobilisation solange an, bis die intrazellulären Calciumspeicher der Endothelzellen wieder gefüllt sind, wodurch sich das flache Auslaufen der Kurve in Abbildung 7 begründen lässt [45] - [48] [67] [86].

Um zu erkennen, ob eine Abhängigkeit zwischen dem Calciumanstieg und der NAD(P)H-Oxidase besteht, wurden weitere Calciummessungen mittels Fura-2-Ratio mit dem Inhibitor der NAD(P)H-Oxidase DPI durchgeführt (Abbildung 9). Die mit Cyanid inkubierten Endothelzellen reagierten auch bei vorheriger DPI-Substitution mit einem steilen Calciumanstieg mit Höchstwerten im Zeitraum zwischen 10 und 12 Minuten (Abbildung 8). Dieser Anstieg war im Vergleich zur Kontrolle signifikant.

Allerdings bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dieser Zellgruppe, die sowohl mit Cyanid als auch mit DPI inkubiert wurden, und der, die nur mit Cyanid behandelt wurden. Es zeigte sich ein cyanidinduzierter Calciumanstieg unabhängig von einer Inkubation der HUVECs mit einem Radikalhemmer.

Da es trotz der Hemmung durch DPI zu keiner signifikanten Verminderung der Calciumbildung der cyanidinduzierten HUVECs kommt, lässt sich keine signifikante Abhängigkeit der Calciumbildung von dem NAD(P)H-Oxidase gebildeten ROS-Gehalt nachweisen. Allerdings konnten Hu et al. an *Human Aortic Endothelial Cells* demonstrieren, dass eine Stimulation der NAD(P)H-Oxidase die Reizschwelle der

Calciumausschüttung herabsetzen kann [106]. Sauer et al. spekulieren über eine Beeinflussung der Verteilung und/oder der Effizienz des Calciumsignalweges [58], was die unveränderte Calciumkonzentrationsmessung mit DPI erklären würde, da bei der Fluoreszenzmessung (Abbildung 8) nicht die Effizienz, sondern die Konzentration gemessen wird. Die genaue Interaktion zwischen ROS und Calcium ist allerdings noch nicht ausreichend erforscht.

Fluoreszenzmessungen mit DCF bestätigten die vermehrte ROS-Bildung unter Cyanid-Gabe mit einem Maximum bei 10 Minuten. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Cyanid stimulierten HUVECs und der Kontrollgruppe. Weitere Fluoreszenzmessungen mit Cyanid inkubierten HUVECs, die mit dem Calciumchelator BAPTA behandelt wurden, brachten neue Erkenntnisse. Verliefe die DCF-Messkurve bei den reinen Cyanid-Versuchen mit einem steilen Anstieg und bis zum Versuchsende mit einer relativ hohen Amplitude, so reagierten die HUVECs bei der vorherigen Zugabe von BAPTA (10 $\mu\text{mol/l}$) bei Cyanid-Substitution mit einem, im Vergleich zum Cyanid-Verlauf, flacheren Beginn. Auch der Kurvenverlauf zeigte im Allgemeinen eine geringere Steigung und eine niedrigere Amplitude. Es besteht eine Signifikanz zwischen den mit Cyanid inkubierten Endothelzellen und den vor Cyanid-Gabe mit BAPTA stimulierten Zellen (Abbildung 5 und 6). Der cyanidinduzierte Radikalanstieg ist folglich calciumabhängig. Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Versuchen überein, bei denen mit Calciumantagonisten eine ROS-Bildung verhindert werden konnte [49]. Da in den vorangegangenen Proliferationsmessungen die NAD(P)H-Oxidase als ROS-bildendes Enzym identifiziert werden konnte, kann für den in Abbildung 5 dargestellten Anstieg der ROS, bei alleiniger Cyanid-Gabe, die NAD(P)H-Oxidase verantwortlich gemacht werden. Eine hypoxieinduzierte NAD(P)H-Oxidase vermittelte ROS-Bildung in humanen Endothelzellen kann folglich durch Calciumantagonisten gemindert werden.

Versuche mit anderen Endothelzellen zeigten, dass die durch die NAD(P)H-Oxidase entstandenen ROS über den MEK/ERK-Signaltransduktionsweg zu einer Proliferation der Endothelzellen führen [49] [58] [77] [95] [96]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ROS einen regulierenden Einfluss auf verschiedene Transkriptionsfaktoren wie *Nuclear Factor κB* (NF- κB), *Aktivator Protein 1* (AP-1), SP-1 und *Hypoxia-inducible Factor* (Hif-1 α) haben [58] [74] [97] [98] [99].

Da der hypoxieinduzierte ROS-Anstieg durch einen Calciumchelator (BAPTA) inhibiert werden kann, die Calciumkonzentration andererseits aber bei einer Hemmung der NAD(P)H-Oxidase (durch DPI) unverändert bleibt, lässt sich folgende Signalkaskade vermuten:

Ein durch Hypoxie induzierter Calciumanstieg bewirkt in HUVECs eine erhöhte Radikalbildung. Die gesteigerte ROS-Bildung steht über vermehrte Aktivität der NAD(P)H-Oxidase im Zusammenhang mit der Aktivierung des MEK/ERK-Signaltransduktionsweges und nimmt über Transkriptionsfaktoren, wie *Nuclear Factor κ B* (NF- κ B), *Aktivator Protein 1* (AP-1), SP-1 und *Hypoxia-inducible Factor* (Hif-1 α), Einfluss auf die Endothelzellproliferation.

Dies stimmt mit den in der Literatur beschriebenen Erkenntnissen über Low-Density Lipoprotein (LDL), Lysophosphatidylcholin (LPC) und ROS überein: Es konnte gezeigt werden, dass LPC und oxidiertes LDL die Endothelzellproliferation durch Steigerung der NAD(P)H-Oxidaseaktivität induzieren. Dementsprechend kommt es sowohl zu einer vermehrten ROS-Bildung als auch zu einem Calciumanstieg, was im weiteren Verlauf eine gesteigerte Endothelzellproliferation induziert [77] [89] [107].

4.3 Statine beeinflussen die cyanidinduzierte endotheliale Proliferation

Wie bereits erwähnt, haben Statine sowohl auf atherosklerotische Läsionen als auch auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität einen reduzierenden Einfluss [61]. Darüber hinaus reduzieren Statine die Proliferation von Endothelzellen, was sich hemmend auf die intimale Neovaskularisation auswirkt und sowohl Einfluss auf das Plaquewachstum als auch auf die Tumorausdehnung hat [62] [63] [27].

Die hypoxieassoziierte Proliferation von Endothelzellen spielt eine wichtige Rolle in der Pathologie der Angiogenese, deshalb war es von Interesse, herauszufinden, ob Statine Einfluss auf die cyanidinduzierte Proliferation von HUVECs haben. Durch die Proliferationsmessungen mittels Zellzählung konnte gezeigt werden, dass bei Stimulation der Endothelzellen durch die Statine Simvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin die cyanidinduzierte Proliferation signifikant reduziert werden konnte. Jedes der Statine erzeugte eine Reduktion der mitogenen Antwort der Endothelzellen auf die Stimulation mit Cyanid (Siehe Abbildung 10).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Erkenntnisse aus früheren Studien [78]. In Versuchen mit HUVECs ist gezeigt worden, dass die Statine Cerivastatin, Simvastatin und Fluvastatin die durch oxidiertes Low-Density Lipoprotein und Lysophosphatidylcholin gesteigerte endotheliale Proliferation senken. Des Weiteren ist in der Literatur beschrieben, dass die LPC-induzierte Endothelzellproliferation eine Steigerung der NAD(P)H-Oxidase bewirkt. Auf diese Weise werden eine ROS- und eine Calciumsteigerung induziert. Der Zusammenhang zwischen der hypoxieinduzierten Endothelzellproliferation und der Statinwirkung wird im Abschnitt 4.4 näher erläutert. Ob die statininduzierte Hemmung der Endothelzellproliferation, in beiden Fällen Hypoxie- und LPC-induziert, über die Calcium- und ROS-Konzentration geregelt ist, ist nicht geklärt. Nachgewiesen ist somit, dass die Statinstimulation von HUVECs sowohl eine durch LDL/LPC-hervorgerufene Proliferation als auch eine hypoxieinduzierte Proliferation hemmt [40] [77] [88] [89] [107].

In früheren Studien wurde nachgewiesen, dass Statine in Endothelzellen Apoptose induzieren können. Deshalb war es notwendig, zu prüfen, ob die Gabe von Statinen in den aufgeführten Konzentrationen proliferationshemmend ist oder eine Steigerung der Zellsterblichkeit bewirkt [79] [80]. Der durchgeführte BCECF-Release-Versuch hat gezeigt, dass Statine in den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentrationen keinen Apoptoseanstieg der kultivierten Endothelzellen bewirken, da die BCECF-Fluoreszenzmessungen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Minderung der Zellviabilität zeigte. Dieses Ergebnis steht in vermeintlicher Diskrepanz zu Studien von Kaneta et al. [79] und Li et al. [80]:

Bei Kaneta et al. [79] wurde gezeigt, dass hydrophobische 3-Hydroxy-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) Reduktase Hemmer (Statine) eine Apoptose induzieren. Dargestellt wurde eine verminderte Zellviabilität, die mittels *Microtiter-Plate Reader* bestimmt wurde. Die dort verwendeten HMG-CoA-Reduktase-Hemmer waren Lovastatin, Simvastatin, Atorvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin. Es hat sich bei dieser Studie gezeigt, dass es Statine wie Pravastatin gibt, die keine Apoptose vermitteln. Die von Kaneta et al. untersuchten Zellen waren allerdings nicht human, sondern Ratten-PVECs (*Pulmonary Vein Endothelial Cells*).

Li et al. [80] zeigten, dass die Gabe von Lovastatin einen konzentrationsabhängigen Zelltod vermittelt. Verwendet wurden hierbei Konzentrationen im Bereich von 3-30

$\mu\text{mol/l}$ mit einer Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Apoptose wurde mittels zytoplasmatischen Histon-assoziierten DNA-Fragmenten und Caspase-3-Aktivität gemessen. Diese Versuche wurden mit HUVECs durchgeführt [81].

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurden die beschriebenen Experimente im Gegensatz zu Kaneta et al. mit HUVECs durchgeführt. Es ist nachgewiesen, dass Statine bei HUVECs Apoptose erzeugen können, dies ist allerdings, wie bei Li et al. beschrieben, konzentrationsabhängig. Kaneta et al verwendeten Dosen von 50 $\mu\text{mol/l}$ Simvastatin, 50 $\mu\text{mol/l}$ Fluvastatin und 50 $\mu\text{mol/l}$ Cerivastatin. Li et al. führten Versuche mit Lovastatinkonzentrationen von 30 $\mu\text{mol/l}$ durch und wiesen einen signifikanten Apoptoseanstieg nach. Im Vergleich dazu liegen die in der vorliegenden Studie verwendeten Konzentrationen mit Cerivastatin (0,1 $\mu\text{mol/l}$), Simvastatin (5 $\mu\text{mol/l}$) und Fluvastatin (2,5 $\mu\text{mol/l}$) weit unter den von Li et al. und Kaneta et al. beschriebenen Konzentrationen. Hinzu kommt eine Diskrepanz in der Inkubationszeit, die bei Kaneta et al. mit 24 Stunden, bei Li et al. mit 48 Stunden beschrieben werden. Im Vergleich dazu lagen die hier verwendeten Inkubationszeiten bei 60 Minuten [79] [80].

Die in Abbildung 11 aufgeführten Ergebnisse der BCECF-Messungen zeigen, dass die verwendeten Statine in den betreffenden Konzentrationen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen keinen erhöhten Zelltod bewirken. Im Gegensatz dazu zeigt die Positivkontrolle für sterbende Zellen mit H_2O_2 eine signifikante Erhöhung des Zelltodes.

Die in dieser Studie verwendeten Statine Simvastatin, Cerivastatin und Fluvastatin induzieren in den angewendeten Konzentrationen (Sim 5 $\mu\text{mol/l}$, Ceri 0,1 $\mu\text{mol/l}$, Flu 2,5 $\mu\text{mol/l}$) bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei HUVECs im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikant höhere Zelltodrate.

Ein entscheidender Regulationspunkt zur Biosynthese von für die Plasmamembran jeder Zelle notwendigem Cholesterin ist das β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-CoA (HMG-CoA). Durch die HMG-CoA-Reduktase entsteht aus HMG-CoA unter Verbrauch von 2 NAD(P)H durch Reduktion die Mevalonsäure (Mevalonat). Um zu zeigen, dass Statine in den vorliegenden Konzentrationen und Inkubationszeiten einen proliferationshemmenden Effekt besitzen, wurde den Zellen Mevalonat zugeführt. Durch die Zugabe des Endprodukts der HMG-CoA-Reduktase sollte der hemmende Effekt der Statine auf die HMG-CoA-Reduktase wieder aufgehoben werden. Es sollte

gezeigt werden, ob dadurch auch die proliferationshemmende Wirkung der Statine auf die cyanidinduzierte Proliferation reversibel ist. In der Tat kam es bei gleichzeitiger Substitution von Cyanid, Statinen und Mevalonat in den verwendeten Konzentrationen im Vergleich zur nur mit Cyanid stimulierten Endothelzellgruppe zu keinen signifikanten proliferationshemmenden Effekten (Abbildung 12). Der durch die Statine erzeugte Rückgang der cyanidinduzierten Proliferation konnte durch Zugabe von Mevalonat korrigiert werden, die alleinige Inkubation von Mevalonat bewirkte kein gesteigertes Endothelzellwachstum, verglichen mit der Kontrollgruppe der nicht stimulierten Zellen [85].

Da die statininduzierte Reduktion der mitogenen Zellantwort durch die Applikation von Mevalonat reversibel war, kann gefolgert werden, dass dieser Effekt speziell auf die Inhibition des HMG-CoA-Reduktase-Signaltransduktionsweges zurückzuführen und nicht mit einer apoptosebedingten Signalkaskade in Verbindung zu bringen ist.

4.4 Statine beeinflussen die Bildung von *Reaktive Oxygen Species* und den Calciumanstieg

Von weiterem Interesse war es, herauszufinden, über welchen Mechanismus die Statine auf die Cyanid-Stimulation Einfluss nehmen. Weitere Versuche mit der Fura-2-Fluoreszenzmessung sollten darüber Aufschluss geben, ob Statine die intrazelluläre Calciumausschüttung modulieren.

Tatsächlich konnte in der hier vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass Statine die cyanidinduzierte Calciumausschüttung verhindern. Abbildung 13 zeigt, dass jedes der verwendeten Statine bei simultaner Cyanid-Applikation den Calciumanstieg hemmt. Cerivastatin hatte nach 10 min den stärksten Effekt auf den Calciumanstieg, gefolgt von Simvastatin und Fluvastatin (Abbildung 14).

Dass Statine neben der Calciumausschüttung zusätzlich die Radikalbildung reduzieren, konnte in DCF-Fluoreszenzmessungen, die in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt sind, demonstriert werden. Auch hier konnte nach simultaner Verabreichung von Cyanid festgestellt werden, dass Cerivastatin, Simvastatin und Fluvastatin nach 30 Minuten einen starken inhibierenden Effekt auf die ROS-Bildung bewirken (Abbildung 16).

Statine hemmen folglich sowohl die durch hypoxieinduzierte Calciumausschüttung als auch die ROS-Bildung. Auf die genaueren Mechanismen und Hintergründe wird später in diesem Abschnitt eingegangen.

Durch Hypoxie erzeugte Angiogenese ist in der Vergangenheit Objekt vieler Untersuchungen gewesen. Ein wichtiger Signalmechanismus, der dabei entdeckt und untersucht wurde, ist die Regulation mit VEGF [3] [82] [83].

Der antiproliferative Effekt der Statine kann mit einer Herunterregulierung des VEGF oder dessen Rezeptor begründet werden, wie es Wilson et al. [84] beschrieben haben. Auf der anderen Seite zeigten Schäfer et al. einen autonomen proliferativen Effekt auf Hypoxie (s.o.), der nicht von VEGF abhängig ist [6] [7]. Aus der Literatur ist bekannt, dass die MAPKinase PDGF-Rezeptor-vermittelt (*Plated Derived Growth Factor*) einen Grb2/SOS-Proteinkomplex rekrutiert. Es wird ein in der Membran verankertes monomeres G-Protein Ras aktiviert, welches in seine GTP (Guanosin-5'-Triphosphat) bindende Form übergeht: Ras-GTP. Ras-GTP rekrutiert seinerseits die Serin/Threonin-Kinase Raf-1 und bewirkt darüber eine Aktivierung der MAPK-Kinase. Bei der MAPK-Kinase handelt es sich um eine Threonin/Tyrosin-Kinase, welche die mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) phosphoryliert [39] [76].

Auch konnte in der Literatur gezeigt werden, dass eine in Endothelzellen hervorgerufene Hypoxie eine frühe Aktivierung der p42/p44 mitogen aktivierten Protein Kinase fördert [39]. Immunohistochemische Analysen haben gezeigt, dass unter „realer“ Hypoxie, genauso wie durch Chemikalien, z.B. durch Rotenone herbeigeführte hypoxische Zustände, eine verstärkte Translokation der p42 MAPKinase in den Nukleus stattfindet. Diese Translokation konnte durch Hemmung des hypoxiebedingten zytosolischen Calciumanstieges unterdrückt werden [6]. Die Verminderung des Calciumanstiegs wirkte sich nur auf die Translokation, jedoch nicht negativ auf die p42 MAPKinase-Aktivität aus. Da der frühe Anstieg von Calcium den späteren Einstrom begünstigt, sind alle Prozesse, die zur Unterdrückung der Translokation über den frühen Einstrom führen, gleichzeitig hemmend für den späten Calciumanstieg. Weiterhin ist sowohl der Calciumanstieg als auch die Translokation der p42 MAPK energieabhängig [6].

Hypoxische Bedingungen führen folglich zu einer Calcium vermittelten proliferativen Endothelzellantwort, wobei eine hypoxie-assoziierte Calciumausschüttung für die Translokation der phosphorylierten MAPK in den Nukleus notwendig ist. Diese

proliferativen Effekte sind alle unabhängig von Transkriptionsfaktoren, wie Adenosin oder VEGF [6].

Schäfer et al. demonstrierten in ihrer Studie, dass die hypoxieinduzierten ROS die MAPK-Kinase aktivieren und dadurch wiederum die NAD(P)H-Oxidaseleistung erhöht wird [7].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine cyanidinduzierte Hypoxie eine Proliferationserhöhung bewirkt, die sowohl durch einen Calciumanstieg als auch durch eine ROS-Erhöhung erzeugt wird. Die entstehende ROS-Bildung ist von dem hypoxiebedingten Calciumanstieg abhängig. Jeder einzelne dieser Mechanismen ließ sich durch die Inkubation der Endothelzellen mit Statinen reduzieren. Auch konnte durch die Statine eine Proliferationserhöhung verhindert werden. Setzt man diese Fakten in Bezug zu den weiter oben aufgeführten Erkenntnissen aus der Literatur [6] [7] [39] [76], so kann davon ausgegangen werden, dass es eine Beziehung zwischen der cyanidinduzierten hypoxievermittelten Calciumbildung, welche zum Teil einer durch NAD(P)H-Oxidase hervorgerufenen ROS-Erhöhung führt, und der bei Schäfer et al. [6] [7] beschriebenen Aktivierung der MEK/MAPK gibt. Die MEK/MAPK, die eine Aktivierung der p42/44 MAP-Kinasen durch Phosphorylierung am Threonin- und am Tyrosin- Rest bewirkt, führt wiederum zu Steigerung NAD(P)H-Oxidaseaktivität, wobei die Calciumerhöhung sowohl Einfluss auf die Radikalbildung (NAD(P)H-Oxidaseaktivität) als auch auf die Translokation der MAP-Kinasen in den Zellkern hat. Man kann spekulieren, dass eine direkte Wechselwirkung zwischen der MEK/MAPK, den ROS, der Calciumbildung und der NAD(P)H-Oxidase besteht, da in den Fluoreszenzmessungen (Abbildung 15) und Proliferationsuntersuchungen (Abbildung 10 und Abbildung 12) der vorliegenden Studie ein proliferationsmindernder Effekt der Statine nachgewiesen werden konnte, welcher durch Änderungen der Radikalbildung induziert wird. Andere Arbeitsgruppen fanden übereinstimmende Ergebnisse in Endothelzellen und auch bei glatten Gefäßmuskelzellen [6] [7] [39] [76] [93] [94]. Auch die Calciumerhöhung, die durch cyanidassoziierte Hypoxie induziert ist, kann durch Statine beeinflusst werden. Die verminderte Calciumkonzentration verhindert die autonome proliferative Wirkung der Hypoxie. Dieser Effekt resultiert in einer Reduktion der Radikalbildung. Man kann vermuten, dass die statininduzierte Calciumreduktion bei HUVECs eine zusätzliche Wirkung auf die Enzymtranslokation in den Nukleus hat. Da die Hypoxie vermittelte

Calciumfreisetzung aus einer frühen Calciumfreisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum und einem daraus resultierenden späten progressiven Calciumanstieg von extrazellulär in die Zelle besteht und die Unterdrückung des frühen Einstromes eine Hemmung der Translokation der p42 MAPK bewirkt, kann folgende Vermutung angestellt werden [6] [45] - [48] [67] [86]:

Der antiproliferative Effekt der Statine erfolgt durch Unterdrücken des MAPK-Signaltransduktionsweges. Bedingt durch eine Hemmung des zytosolischen Calciumanstieges kommt es zu einer verminderten Translokation der p42 MAPK, was zu einer reduzierten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führt. Eine geringere DNA-Transkription mit antiproliferativem Effekt ist die Folge.

Aono et al. haben in einer Arbeit mit HUVECs gezeigt, dass die hypoxieinduzierte Calciumveränderung durch einen Inhibitor der Phospholipase C (PLC) gehemmt werden kann [87]. Außerdem demonstrierten sie, dass die Calciummobilisation sowohl durch einen internen Calciumspeicher als auch durch das Einfließen von extrazellulär geschieht [87]. Ähnliche Mechanismen können auch für den Effekt der Statine auf den cyanidinduzierten Calciumstrom verantwortlich sein. Yokoyama et al. zeigten mit ihrer Studie den Effekt der HMG-CoA-Reduktasehemmer auf den Einstrom und der intrazellulären Mobilisation von Calcium in humanen Endothelzellen der Aorta. Die Calciummobilisation ist Lysophosphosphatidylcholin (LPC)-induziert und kann durch eine Blockade der PLC Aktivität durch Inhibition der GGPP-abhängigen (Geranylgeranyl-Pyrophosphat-) Lipid-Modifikation von Rho mit Statinen gehemmt werden. Das dabei verwendete Statin war Fluvastatin [88].

Abbildung 5 und Abbildung 6 zeigen, dass die Calciumerhöhung für die NAD(P)H-Oxidase-abhängige ROS-Bildung notwendig ist. Der antioxidative Effekt der Statine ist folglich auf die Hemmung des Calciumsignalweges zurückzuführen. Setzt man diese Ergebnisse mit den Erkenntnissen der Forschungsgruppe Yokoyama in einen Zusammenhang, zeigt sich, dass Statine den durch Cyanid induzierten Calciumanstieg durch eine Blockade der PLC-Aktivität und eine Hemmung der GGPP-abhängigen Lipid-modifikation von Rho beeinflussen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Statine zusätzlich eine Proliferationsminderung bewirken, indem sie die von Schäfer et al. beschriebene calciumabhängige Translokation der phosphorylierten MAPK in den Nukleus über die genau dort wirkende Calciumausschüttung regulieren. Gleichzeitig wird eine vermehrte Radikalbildung verhindert, indem, wie in 4.2 beschrieben, über eine direkte Wechselwirkung mit dem

MEK/MAPK–Signalweg die NADPH- Oxidase gehemmt wird [6] [7], was über Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B, AP-1, SP-1 und Hif-1 α , zu einer Verringerung der mitogenen Zellantwort führt [58] [74] [97] [98] [99].

4.5 Klinische Aspekte

Unter klinischen Aspekten lassen sich aus den gewonnenen Erkenntnissen folgende Schlüsse zum Krankheitsgeschehen der Arteriosklerose ziehen:

Die Proliferation der Endothelzellen ist in hohem Maße an der Angiogenese der Intimazellschicht beteiligt und hat dadurch einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung der Arteriosklerose [13] [14] [15]. Die arteriosklerotische Verdickung der Intima führt zu einer relativen Ischämie der Gefäßwand. Die hieraus resultierende Hypoxie stimuliert die Proliferation der Endothelzellen und bewirkt auf diese Weise Angiogenese. Die Folge ist eine Durchsprössung der Plaques mit Mikrogefäßen [100]. Jedoch können die durch atherosklerotische Bedingungen entstandenen neuen Gefäße zu einer Destabilisation der atherosklerotischen Plaques führen, denn die neuen Gefäße sind, im Vergleich zu Gefäßen, die unter physiologischen Bedingungen entstanden sind, sehr schwach und verstärken durch „intraplaque Haemorrhagien“ den pathologischen Zustand [16]. Dies führt zu einer schnelleren Volumenzunahme des Plaque und einer dadurch bedingten Instabilität. Die klinischen Folgen sind unter anderem arterielle Dissektionen, Ulzerationen, Thrombosen und koronare Plaquerupturen mit der Folge eines Myokardinfarktes [17] [18] [14].

Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass durch Statine die durch Hypoxie entstandene Proliferation von Endothelzellen verhindert werden kann. Somit können Angiogenese und die Durchsprössung atherosklerotischer Plaques mit Mikrogefäßen gemindert werden, was einer Destabilisierung der Plaques und somit pathologischen Komplikationen entgegenwirkt. Hierdurch wird deutlich, wie wichtig ein genauer Überblick über die pathologische Wirkung der hypoxieinduzierten Endothelzellproliferation ist. Sie stellt einen bedeutenden Faktor im Fortschreiten des Krankheitsbildes der Arteriosklerose dar.

Die gewonnenen Erkenntnisse können helfen, den komplizierten Wirkungsmechanismus der Statine und ihren Angiogenese-hemmenden Effekt, der das

Voranschreiten vaskulärer Krankheiten verhindert, besser zu verstehen, um sie dadurch optimaler einsetzen zu können.

Welche weitere wichtige Rolle der Einsatz von Statinen bei der Behandlung von Tumorerkrankungen hat, wurde bereits in vielen bedeutenden Studien dargestellt (siehe oben). Die Neovaskularisation durch Endothelzellproliferation hat auch auf die Tumorentwicklung einen entscheidenden Einfluss, denn das Wachstum und die Ausbreitung eines Tumors ist nicht nur von der Proliferation der Tumorzellen an sich, sondern auch von der Gefäßbildung im Tumor und somit auch von der Proliferation der Endothelzellen in den Tumorgefäßen abhängig [1] [63].

Durch ein von Fernandez et al. [30] durchgeführtes Experiment wurde noch einmal die Bedeutung der Angiogenese in der Tumorentwicklung verdeutlicht. Es führte zu der Empfehlung, den Einsatz Angiogenese-inhibierender Therapien als effektives Mittel zur Behandlung von Prostatakrebs zu verwenden. Durch eine Blockade der Tumorzellproliferation mittels Mitomycin C konnte das künstlich erzeugte Wachstum von humanen Prostatakarzinomen in Mäusen nahezu vollständig inhibiert werden. Auf der anderen Seite bewirkte das bcl-2 Onkogen (B-Cell-Lymphoma 2 Onkogen) eine Erhöhung der Tumorzellproliferation und Angiogenese. Wurden mit bcl-2 Onkogen behandelte Mäuse gleichzeitig mit einem Angiogeneseinhibitor (TNP-470) behandelt, wurde der Effekt des bcl-2 Onkogen negiert. Das Tumorzellwachstum wurde sogar, verglichen mit bcl-2 Onkogen unbehandelten Tumoren, auf unter 10% bis 15% gemindert [30]. Dieses Experiment zeigt die Relevanz der Proliferation von Endothelzellen und verdeutlicht, dass es nicht möglich ist, ohne endotheliale Proliferation Tumormasse auszubilden. Deshalb ist es von Interesse, die zu dieser Proliferation führenden Mechanismen und den Angriffspunkt der Statine besser zu verstehen, denn sowohl Tumorzellproliferation als auch Angiogenese sind notwendig, um einen nachweisbaren Tumor zu erzeugen [27]. Statine spielen in der Tumorthherapie eine immer bedeutendere Rolle. In der Literatur ist beschrieben, dass speziell Statine verschiedene antineoplastische Eigenschaften sowohl auf die Angiogenese, das Tumorwachstum als auch auf die Metastasierung ausüben [92].

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Versuchsergebnisse zeigen, dass die Statine Cerivastatin, Simvastatin und Fluvastatin die intrazelluläre Calciumausschüttung und die calciumabhängige, NAD(P)H-Oxidase induzierte ROS-

Diskussion

Bildung verhindern, wodurch sie einen inhibierenden Effekt auf die hypoxieinduzierte Proliferation von Endothelzellen bewirken.

Da der Effekt der verschiedenen Statine Cerivastatin, Fluvastatin und Simvastatin sowohl auf die Calciumausschüttung als auch auf die ROS-Bildung und somit auch auf die Endothelzellproliferation gleich war, lässt dies Rückschlüsse auf einen Gruppeneffekt der Statine zu. Mit dieser Arbeit konnte ein bisher unbekannter Aspekt des Wirkmechanismus von Statinen auf Endothelzellen näher beleuchtet werden.

Die gesammelten Ergebnisse tragen dazu bei, die Wirkung der Statine auf zellulärer Ebene und somit den komplizierten Pathomechanismus des atherosklerotischen Krankheitsbildes und die angiogenetischen Einflüsse bei Tumorwachstum besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

Pathologische Hypoxie spielt bei einer Vielzahl von Krankheiten wie Atherosklerose und Krebs eine wichtige Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt verschiedener Statine auf eine hypoxieinduzierte Signalkaskade von Endothelzellen untersucht. Humane Endothelzellen aus Umbilikalvenen (HUVEC) wurden mit Natriumcyanid (CN) behandelt, und es wurde dadurch eine transiente Hypoxie simuliert. Diese Hypoxie verursachte eine signifikante Erhöhung des Zellwachstums. Es konnte gezeigt werden, dass die hypoxieinduzierte Proliferation durch verschiedene Inhibitoren reduziert werden kann. Zum einen wird das Wachstum durch den Calciumchelator BAPTA, zum anderen durch den ROS-Scavenger N-Acetylcystein (ACC) inhibiert.

Die wichtigen Radikal-produzierenden Enzyme der Endothelzellen wurden gehemmt, um das für den ROS-vermittelten Effekt relevante Enzym zu identifizieren: Die Cyclooxygenase wurde durch Acetylsalicylsäure, die Xanthin-Oxidase durch Allopurinol, die eNOS durch L-NMMA, die NAD(P)H-Oxidase und die eNOS durch DPI geblockt. Der Cyanid-abhängige ROS-Effekt konnte auf die NAD(P)H-Oxidase zurückgeführt werden, da nur DPI das cyanidinduzierte Endothelzellwachstum hemmt.

Mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen konnte nachgewiesen werden, dass es durch Inkubation mit Cyanid zu einer signifikanten Zunahme von intrazellulärem Calcium und ROS kommt. Weiterhin zeigte sich, dass der Anstieg von ROS zu einem gewissen Teil in einer Abhängigkeit zum Calcium steht. Eine Abhängigkeit des Calciumanstiegs von der ROS-Zunahme konnte nicht festgestellt werden.

Die Statine Simvastatin, Fluvastatin und Cerivastatin bewirkten eine Reduktion der cyanidinduzierten Proliferation sowie eine Herabsetzung der Calciumausschüttung und eine verminderte ROS-Bildung. Die Zugabe von Mevalonat zeigte eine komplette Reversion des durch Statine erzeugten antiproliferativen Effekts. Ferner konnte in den vorliegenden Konzentrationen eine statininduzierte Apoptoseerhöhung ausgeschlossen werden, da sich mittels BCECF-Fluoreszenzmessung keine signifikante Veränderung der Zell-Viabilität feststellen ließ.

Zusammenfassend kann folgendes Fazit gezogen werden: Die vorliegende Studie belegt, dass Statine eine hypoxieassoziierte Endothelproliferation hemmen, in dem sie einen Anstieg des intrazellulären Calcium und der ROS-Bildung verhindern.

Abstract

Pathological hypoxia plays an important role in many diseases, such as atherosclerosis, cancer, and rheumatoid arthritis. The objective of the present study was to examine the effects of different statins on hypoxia-induced endothelial cell signalling. Human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) were treated with NaCN to simulate a transient hypoxia. The CN-induced increase of endothelial cell numbers was significantly reduced by the calciumchelator BAPTA, or the reactive oxygen species (ROS) scavenger N-acetylcysteine (ACC).

Inhibitors of the major endothelial radical sources were applied to find the enzyme, that is responsible for the CN-induced effect on the proliferation of HUVEC: xanthin-oxidase blocked by Allopurinol, cyclo-oxygenase blocked by acetylsalicylic acid, eNOS blocked by L-NMMA, NAD(P)H-oxidase and eNOS blocked by DPI. Since Diphenyleneiodonium (DPI) but no other inhibitors were able to prevent CN-dependent endothelial cell growth, the NAD(P)H-oxidase was identified as source of the CN-dependent ROS generation.

Intracellular-calcium and –ROS, analysed by fluorescence imaging, were significantly increased by CN. Interestingly, the CN-induced increase of ROS was in part calcium-dependent, whereas the calcium-increase was not ROS-dependent.

Simvastatin, Fluvastatin, and Cerivastatin all reduced CN-induced proliferation, ROS generation and calcium-increase. Cell viability was not reduced by statins and the antiproliferative effect was completely reversed by mevalonate.

In summary the data of this study demonstrate, that statins block hypoxia-associated endothelial proliferation by preventing the increase of calcium and ROS formation.

6. Literaturverzeichnis

1. **Folkman J.** Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat. Med. 1995;1:27-31.
2. **Munoz-Chapuli R, Quesada AR, Angel Medina M.** Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. Cell Mol. Life Sci. 2004;61:2224-2243.
3. **Waltenberger J, Mayr U, Pentz S, Hombach V.** Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. Circulation 1996;94:1647-1654.
4. **Yamaoka-Tojo M, Ushio-Fukai M, Hilenski L, Dikalov SI, Chen YE, Tojo T, Fukai T, Fujimoto M, Patrushev NA, Wang N, Kontos CD, Bloom GS, Alexander RW.** IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species-dependent endothelial migration and proliferation. Circ. Res. 2004;95:276-283.
5. **Klagsbrun M, D'Amore PA.** Vascular endothelial growth factor and its receptors. Cytokine Growth Factor Rev. 1996;7:259-270.
6. **Schäfer M, Ewald N, Schäfer C, Stapler A, Piper HM, Noll T.** Signaling of hypoxia-induced autonomous proliferation of endothelial cells. FASEB J. 2003;17:449-451.
7. **Schäfer M, Schäfer C, Ewald N, Piper HM, Noll T.** Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cells to hypoxia. Circ. Res. 2003;92:1010-1015.
8. **Haller H.** Risk factors for cardiovascular disease and the endothelium. In: *Vascular Endothelium. Physiology, Pathology, and Therapeutic Opportunities*, edited by Born GVR, and Schwartz CJ.. Stuttgart, Germany: Schattauer, 1997;273-286.

9. **Quaschnig T, Ruschitzka FT, Maier W, Lüscher TF.** Die Rolle des Endothels bei der Entstehung und Behandlung von Gefäßkrankheiten; Internist 2000;41:355-362.

10. **Furchgott RF, Zawadzki JV.** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine; Nature 1980;288 (5789):373-376.

11. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis -- an update. N. Engl. J. Med. 1986;314(8):488-500.

12. **Ross R.** Mechanisms of Disease: Atherosclerosis – An Inflammatory Disease; New England Journal of Medicine 1999;340(2):115-126.

13. **Kuzuya M, Satake S, Esaki T, Yamada K, Hayashi T, Naito M, Asai K, Iguchi A.** Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque, J. Cell Physiol. 1995;164: 658-667.

14. **O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, Schwartz SM.** Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. Am. J. Pathol. 1994;145:883-894.

15. **Tenaglia AN, Peters KG, Sketch MH, Annex BH.** Neovascularization in atherectomy specimens from patients with unstable angina: implications for pathogenesis of unstable angina. Am. Heart. J. 1998;135:10-14.

16. **Mofidi R, Crotty T B, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaveny TV.** Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. Br. J. Surg. 2001;88:945-950.

17. **Barger AC, Beeuwkes R, Lainey LL, Silverman KJ.** Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. New Engl. J. Med. 1984; 310:175–177.

18. **Hayden MR and Tyagi SC.** Vasa vasorum in plaque angiogenesis, metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: a malignant transformation. *Cardiovasc. Diabetol.* 2004;3:1.
19. **Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Leapman SB, Folkman J.** Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J. Exp. Med.* 1972;136:261-276.
20. **Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D and Patz A.** Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res.* 1976; 36:2807-2812.
21. **Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J.** Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat. Med.* 1995;1:149-153.
22. **Hanahan D, Folkman J.** Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-364.
23. **Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, Byers HR, and Folkman J.** Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 1997;94:861-866.
24. **Folkman J.** Incipient angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000;92:94-95.
25. **Achilles EG, Fernandez A, Allred EN, Kisker O, Udagawa T, Beecken WD, Flynn E, Folkman J.** Heterogeneity of angiogenic activity in a human liposarcoma: a proposed mechanism for „no take“ of human tumors in mice. *J.Natl. Cancer Inst.* 2001;93(14):1075-1081.
26. **Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ.** Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *The FASEB J.* 2002;16:1361-1370.

27. **Folkman J.** Angiogenesis. Annual Review of Medicine. 2006;57:1-18.
28. **Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, and Weinberg RA.** Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. Cancer Cell 2003 Mar;3(3):219-231.
29. **Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, Detmar M.** Thrombospondin-2: A potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. PNAS USA 1999;96:14888-14893.
30. **Fernandez A, Udagawa T, Schwesinger C, Beecken W, Achilles-Gerte E, McDonnell T, D'Amanto R.** Angiogenic potential of prostate carcinoma cells overexpressing bcl-2. J. Natl. Cancer Inst. 2001;93(3):208-213.
31. **Chang X, Firestone GL and Bjeldanes LF.** Inhibition of growth factor-induced Ras signaling in vascular endothelial cells and angiogenesis by 3,3'-diindolylmethane. Carcinogenesis 2006;27:541-550.
32. **Koll J and Waltenberger J.** The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. J. Biol. Chem. 1997;272:32521-32527.
33. **Marshall CJ.** Ras effectors. Curr Opin Cell Biol. 1996;8:197-204.
34. **Huang W, Alessandrini A, Crews CM, Erikson RL.** Raf-1 forms a stable complex with Mek1 and activates Mek1 by serine phosphorylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993;90:10947-10951.
35. **Cobb MH and Goldsmith EJ.** How MAP Kinases are regulated. J. Biol. Chem;270:14843-14846.
36. **Wolin MS, Gupte SA, Oeckler RA.** Superoxide in the Vascular System. J. Vasc. Res. 2002;39:191-207.

- 37. Ray LB, Sturgill TW.** Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988;85:3753-3757.
- 38. Cobb MH, Boulton TG, Robbins DJ.** Extracellular signal-regulated kinases: ERKs in progress. *Cell Regulation* 1991;2:965-978.
- 39. Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, and Michiels C.** ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* 2000;468:53-58.
- 40. Nilius B, Droogmans G.** Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* 2001;81:1415-1459.
- 41. Vargas FF, Caviedes PF, Grant DS.** Electrophysiological characteristics of cultured Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Microvascular Research* 1994;47(2):153-165.
- 42. Himmel H, Whorton AR, Strauss HC.** Intracellular Calcium, currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension* 1993;21:112-127.
- 43. Nilius B.** Regulation of transmembrane calcium fluxes in endothelium. *News Physiol Sci* 1991;6:110-114.
- 44. Berridge MJ.** Cytoplasmic calcium oscillations: a two-pool model. *CellCalcium* 1991;12: 63–72.
- 45. Arnould T, Michiels C, Alexandre I, Remacle J.** Effect of hypoxia upon intracellular calcium concentration of human endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 1992;152: 215–221.
- 46. Hu Q, Ziegelstein RC.** Hypoxia/reoxygenation stimulates intracellular calcium oscillations in human aortic endothelial cells. *Circulation.* 2000;102: 2541-2547.

- 47. Aono Y, Ariyoshi H, Sakon M, Ueda A, Tsuji Y, Kawasaki T, Monden M.** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) show Ca^{2+} mobilization as well as Ca^{2+} influx upon hypoxia. *J. Cell Biochem.* 2000;78:458-464.
- 48. Dolor RJ, Hurwitz LM, Mirza Z, Strauss HC, Whorton AR.** Regulation of extracellular calcium entry in endothelial cells: role of intracellular calcium pool. *Am. J. Physiol.* 1992;262:C171–C181.
- 49. Holland JA, O'Donnell RW, Chang MM, Johnson DK, Ziegler LM.** Endothelial cell oxidant production: Effect of NADPH oxidase inhibitors. *Endothelium-New York* 2000;7:109-119.
- 50. Esposito F, Ammendola R, Faraonio R, Russo T, and Cimino F.** Redox control of signal transduction, gene expression and cellular senescence. *Neurochem. Res.* 2004;29:617-628.
- 51. Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG.** Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 2002;55:239-249.
- 52. Mügge A.** The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z Kardiol.* 1998;87:851-864.
- 53. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H.** Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 2003;91:7A- 11A.
- 54. Dröge W.** Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 2002;82:47-95.
- 55. Taniyama Y, Griendling KK.** Reactive oxygen species in vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 2003;42:1075-1081.

- 56. Lassègue B and Clempus RE.** Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2003;285:R277-R297.
- 57. Lambeth JD.** Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 2004;4:181-189.
- 58. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J.** Reaktive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol. Biochem.* 2001;11:173-186.
- 59. Maulik N, Das DK.** Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 2002;33:1047-1060.
- 60. Fattman CL, Schaefer LM, and Oury TD.** Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Rad. Biol. Med.* 2003;35:236-256.
- 61. The Scandinavian Simvastatin Survival Study Group.** Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet.* 1994;344:1383-1389.
- 62. Vincent L, Soria C, Mirshahi F, Oplon P, Mishal Z, Vannier JP, Soria J, Hong L.** Cerivastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylgluaryl coenzym a reductase, inhibits endothelial cell proliferation induced by angiogenic factors In Vitro and angiogenesis in In Vivo Models. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.* 2002;22:623-629.
- 63. Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J.** Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularisation and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 1999;99:1726-1732.
- 64. Bocan TM.** Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 2002;3:1312-1317.

- 65. Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP.** Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* 2002;105:739-745.
- 66. Asakage M, Tsuno NH, Kitayama J, Kawai K, Okaji Y, Yazawa K, Kaisaki S, Takahashi K, Nagawa H.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor (Pravastatin) inhibits endothelial cell proliferation dependent on G1 cell cycle arrest. *Anticancer Drugs*. 2004;15:625-632.
- 67. Schäfer M, Bahde D, Bosche B, Ladilov Y, Schäfer C, Piper HM, Noll T.** Modulation of early $[Ca^{2+}]_i$ rise in metabolically inhibited endothelial cells by xestospongine C. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001;280:1002-1010.
- 68. Shryock JC, Rubio R, Berne RM.** Release of adenosine from pig aortic endothelial cells during hypoxia and metabolic inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1988;254: H223-H229.
- 69. Jaffè EA, Nachman RL, Becker CG, Minick R.** Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphological and immunological criteria; *J. Clin. Inv.* 1973;52:2745-2756.
- 70. Tsien R, Pozzan T.** Measurement of cytosolic free Ca^{2+} with quin2; *Methods Enzymol.* 1980;172:230-262.
- 71. Schäfer C, Walther S, Schäfer M, Dietrich L, Kasseckert S, Abdallah Y, Piper HM.** Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation. *Cardiovasc. Res.* 2003;58:149-155.
- 72. Agullo L, Garcia-Dorado D, Escalona N, Ruiz-Meana M, Inserte J, Soler-Soler J.** Effect of ischemia on soluble and particulate guanylyl cyclase-mediated cGMP synthesis in cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003;284:2170-2176.

- 73. Wei Z, Costa K, Al-Mehdi AB, Dodia C, Muzykantov V, Fisher AB.** Simulated ischemia in flow-adapted endothelial cells lead to generation of reactive oxygen species and cell signaling. *Circ. Res.* 1999;85:682-689.
- 74. Wang GL, Jiang BH, Semenza GL.** Effect of altered redox states on expression and DNA-binding activity of hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995;212:550-556.
- 75. Oosthuyse B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudenbach V, Vermeylen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciort R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P.** Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet.* 2001;28:131–138.
- 76. Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ.** Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1988;255:H554-H562.
- 77. Kuhlmann CR, Lüdders DW, Schaefer CA, Most AK, Backenköhler U, Neumann T, Tillmanns H, Erdogan A.** Lysophosphatidylcholine-induced modulation of Ca^{2+} -activated K^{+} channels contributes to ROS-dependent proliferation of cultured human endothelial cells. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2004;36:675-682.
- 78. Schaefer CA, Kuhlmann CR, Gast C, Weiterer S, Li F, Most AK, Neumann T, Backenköhler U, Tillmanns H, Waldecker B, Wiecha J, Erdogan A.** Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* 2004;41:67-73.
- 79. Kaneta S, Satoh K, Kano S, Kanda M, Ichihara K.** All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003;170:237-243.

- 80. Li X, Liu L, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Sebt SM, Hamilton AD, Harlan JM.** Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2002;277:15309-15316.
- 81. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ.** Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1995;333:1301.
- 82. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N.** Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997;272:23659-23667.
- 83. McCarthy MJ, Crowther M, Bell PR, Brindle NP.** The endothelial receptor tyrosine kinase tie-1 is upregulated by hypoxia and vascular endothelial growth factor. *FEBS Lett.* 1998;423:334-338.
- 84. Wilson SH, Herrmann J, Lerman LO, Holmes DR, Napoli C, Ritman EL, Lerman A.** Simvastatin preserves the structure of coronary adventitial vasa vasorum in experimental hypercholesterolemia independent of lipid lowering. *Circulation* 2002;105:415-418.
- 85. Löffler G, Pertrides P.** *Biochemie & Pathologie*, 7. Auflage, Springer 2003;608-628.
- 86. Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM.** Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 1995;268:H1462–H1470.
- 87. Aono Y, Ariyoshi H, Sakon M, Ueda A, Tsuji Y, Kawasaki T, Monden M.** Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) show $\text{Ca}^{(2+)}$ mobilization as well as $\text{Ca}^{(2+)}$ influx upon hypoxia. *J. Cell Biochem.* 2000;78:458-464.

- 88. Yokoyoma K, Ishibashi T, Ohkawara H, Kimura J, Matsuoka I, Sakamoto T, Nagata K, Sugimoto, K Sakurada S, Maruyama Y.** HMG-CoA reductase inhibitors suppress intracellular calcium mobilization and membrane current induced by lysophosphatidylcholine in endothelial cells. *Circulation* 2002;105:962-967.
- 89. Heinloth A, Heermeier K, Raff U, Wanner C, Galle J.** Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2000;11:1819–1825.
- 90. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY.** A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 1985;260:3440-3450.
- 91. Rink TJ, Tsien RY, Pozzan T.** Cytoplasmic pH and free Mg^{2+} in lymphocytes. *J. Cell Biol.* 1982;95:189-196.
- 92. Hindler K, Cleeland CS, Rivera E, Collard CD.** The role of statins in cancer therapy. *Oncologist.* 2006;11:306-315.
- 93. Baas AS, Berk BC.** Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H_2O_2 and O_2 in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995;77:29–36.
- 94. Deras C, Fay M, Gougerot-Pocidalo MA, El-Benna J.** The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol.* 2000;165:5238–5244.
- 95. Wang N, Verna L, Hardy S, Zhu Y, Ma KS, Birrer MJ, Stemerman MB.** c-Jun triggers apoptosis in human vascular endothelial cells. *Circ Res* 1999;85:387-393.
- 96. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN.** Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996;380:75-79.

- 97. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA.** Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic. Res. Commun.* 1992;17:221-237.
- 98. Abate C, Patel L, Rauscher FJ 3rd, Curran T.** Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 1990;249:1157-1161.
- 99. Wu X, Bishopric NH, Discher DJ, Murphy BJ, Webster KA.** Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol Cell Biol* 1996;16:1035-1046.
- 100. Libby P.** Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372.
- 101. Carmeliet P.** VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis? *Nat. Med.* 2000;6:1102-1103.
- 102. Elliott SJ, Koliwad SK.** Redox control of ion channel activity in vascular endothelial cells by glutathione. *Microcirculation* 1997;4:341-347.
- 103. Kaplin AI, Ferris CD, Voglmaier SM, Snyder SH.** Purified reconstituted inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. Thiol reagents act directly on receptor protein. *J. Biol. Chem.* 1994;269:28972-28978.
- 104. Missiaen L, Taylor CW, Berridge MJ.** Spontaneous calcium release from Inositoltrisphosphate-sensitive calcium stores. *Nature* 1991;352:241-244.
- 105. Eu JP, Sun J, Xu L, Stamler JS, Meissner G.** The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell.* 2000;102:499-509.

- 106. Hu Q, Zheng G, Zweier JL, Deshpande S, Irani K, Ziegelstein RC.** NADPH oxidase activation increases the sensitivity of intracellular Ca^{2+} stores to inositol 1,4,5-trisphosphate in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000;275:15749-15757.
- 107. Cominacini L, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Tosetti ML, Campagnola M, Rigoni A, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T.** Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 2000;275:12633-12638.

7. Abkürzungen

A

- ACC Acetylcystein
- Allo Allopurinol
- AP-1 Aktivator Protein -1
- ASS Acetylsalicylsäure
- ATP Adenosintriphosphat

B

- BAPTA 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N' - tetraacetic acid
- BCECF 2',7'-bis-Carboxyethyl-5',6'-carboxy-fluorescein
- bcl-2 Oncogen B-Cell-Lymphoma 2 Oncogen
- bFGF Basic Fibroblast Growth Factor

C

- Ceri Cerivastatin
- CN Cyanid

D

- DCF-DA 2', 7'-Dichlorofluoresceinacetat
- DPI Diphenyleneiodonium
- DNA Deoxyribonucleic Acid
- DMSO Dimethylsulfid

E

- EBM Endothelial Basal Medium
- EDRF Endothelium Derived Relaxing Factor
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- EGF Epidermal Growth Factor
- ERK Extracellular Signal regulated Protein Kinasen
- ECGS/H Endothelial Cell Growth Supplement /Heparin
- eNOS endothelial NO-synthase

77

Abkürzungen

• NaCN	Natriumzyanid
• NAD(P)H	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
• NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
• NO	Stickstoffmonoxid
• eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i> oder Endotheliale NO-Synthase
O	
• O ₂ ^{••}	Superoxid-anion
• OH [•]	Hydroxyl Radikal
P	
• PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
• PLC	Phospholipase C
R	
• Raf	<i>Ras associated factor</i>
• Ras	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
• ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S	
• SEM	Standardfehler der Mittelwerte
• Sim	Simvastatin
• SOD	Superoxid-dismutase
T	
• TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
• TNF	Tumornekrose Faktor
• Trypsin-EDTA	Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure
V	
• VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>

8. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Sebastian Weiterer

9. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Schaefer CA, Kuhlmann CR, Weiterer S, Fehsecke A, Abdallah Y, Schäfer C, Schäfer M, Mayer K, Tillmanns H, Erdogan A. Statins inhibit hypoxia-induced endothelial proliferation by preventing calcium-induced ROS formation. *Atherosclerosis* 2006;185(2):290-296.

Schaefer CA, Kuhlmann CR, Gast C, Weiterer S, Li F, Most AK, Neumann T, Backenköhler U, Tillmanns H, Waldecker B, Wiecha J, Erdogan A. Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells. *Vascul. Pharmacol.* 2004;41:67-73.

10. Danksagung

Bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützten, möchte ich mich hiermit sehr herzlich bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. A. E. Erdogan, Herrn Dr. Chr. Schaefer sowie Herrn Dr. Chr. Kuhlmann, dafür dass sie diese Dissertation ermöglicht haben. Herrn Dr. Chr. Schaefer und Herrn Dr. Chr. Kuhlmann danke ich darüber hinaus für ihre engagierte Betreuung.

Bei Frau G. Pfeiffer und Frau C. Frey-Krug bedanke ich mich für ihre routinierte Hilfe im Bereich der Zellkultur.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Piper, Herrn PD Dr. Abdallah sowie den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe für die Unterstützung und hilfreichen Anregungen im Calciumlabor.

Darüber hinaus danke ich Frau Dr. M. Schaefer und Frau Dr. A. Most für ihr Interesse und Engagement sowie allen Mitdoktoranden der Arbeitsgruppe.

Besonderer Dank gilt meinem Bruder Alexander Weiterer für seine „nicht wissenschaftliche“ Unterstützung.

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der offiziellen Druckversion entfernt.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5612-4



© galam - Fotolia.com